



Les bactéries entomopathogènes du genre *Xenorhabdus* : description pathologique et génomique de souches à la virulence atténuée

Gaëlle Bisch

► To cite this version:

Gaëlle Bisch. Les bactéries entomopathogènes du genre *Xenorhabdus* : description pathologique et génomique de souches à la virulence atténuée. Bactériologie. Université Montpellier II - Sciences et Techniques du Languedoc, 2014. Français. NNT : 2014MON20050 . tel-01343190

HAL Id: tel-01343190

<https://theses.hal.science/tel-01343190>

Submitted on 7 Jul 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par l'**Université de Montpellier 2**

Préparée au sein de l'école doctorale
**Systèmes intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences,
Hydrosciences et Environnement**

Et de l'unité de recherche
**Diversité, Génomes & Interactions Microorganismes – Insectes
(UMR 1333 INRA-UM2)**

Spécialité **Microbiologie-Parasitologie**

Présentée par **Gaëlle BISCH**

Les bactéries entomopathogènes du genre
Xenorhabdus : description pathologique
et génomique de souches à la virulence
atténuée.

Soutenue le 12 décembre 2014 devant le jury composé de

Frédérique Le Roux, Directrice de recherche, IFREMER	Rapportrice
Eric Duchaud, Directeur de recherche, INRA	Rapporteur
Mathieu Sicard, Professeur, Université Montpellier 2	Examineur
Estelle Jumas-Bilak, Professeur, Université Montpellier 1	Examinatrice
Sophie Gaudriault, Chargée de recherches, INRA	Directrice de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier tous les membres du jury d'avoir bien voulu prendre de leur temps pour juger ce travail.

Un énorme merci à Sophie Gaudriault, ma directrice de thèse, d'avoir accepté de me faire confiance en me confiant ce sujet de thèse il y a trois ans, et de m'avoir guidée dans mes recherches depuis. Merci pour tes conseils précieux, ta patience et ta gentillesse tout au long de ce travail.

Merci à Jean-Claude Ogier et Sylvie Pagès pour leur aide très précieuse tout au long de ces trois années, de m'avoir formée, qui à la génomique, qui à la bactériologie et à la nématologie, et d'avoir pris le temps de répondre à mes questions et de farfouiller dans vos archives quand la situation l'exigeait !

Ce travail a également beaucoup bénéficié des conseils précieux de Bernard Duvic et d'Alain Givaudan. Merci également à Patrick Tailliez d'avoir été mon directeur de thèse par intérim, et d'avoir continué à s'intéresser à ce travail même après avoir cédé sa place.

Merci à Anne Lanois de m'avoir initiée aux joies du clonage, et Nadège Ginibre à celles de la patho sur insectes.

Enfin, merci à tous les autres membres de l'équipe : Jean-Michel Escoubas, Pierre-Alain Girard, Wendy Levrat, Julien Brillard et Christine Laroui, ainsi qu'aux enseignants : Marie-Hélène Boyer-Lavergne, Olivier Thaler, Jean-Luc Aymeric et Robert Zumbhil, pour leur bonne humeur constante et toute l'aide qu'ils ont pu m'apporter. Un merci tout spécial aux indispensables Gaëtan Clabots et Clothilde Gibard, nos fournisseurs officiels d'insectes, ainsi qu'à Amélie Moulin et Michèle Schoenborn pour leur travail de secrétariat rapide et efficace.

Merci également à toute l'équipe « du 4^e », et tout particulièrement aux doctorants passés et présents, Fanny, Marion, Tristan, Cécilia et Pascaline. Marion, tu nous auras été d'une aide précieuse dans le recrutement des coorganisateur des 5^{èmes} journées SPE : Ashraf, Nadine et Martin, et Annabelle et moi vous remercions pour tout le travail fourni par vous quatre ! Merci aussi aux doctorants SPE ayant participé à ce congrès et à celui de Toulouse pour toutes les discussions enrichissantes que nous avons pu avoir.

Merci enfin à Magali Eychenne, Marie Frayssinet, John G. M^c Mullen II et Safia Guenifi d'avoir été un peu plus que des collègues, et d'avoir partagé avec moi les moments de joie, de doute et quelques verres de vin et de bière.

J'en viens à toi, Annabelle, ma copine de thèse durant ces trois années : merci pour les innombrables discussions plus ou moins professionnelles, et merci de m'avoir supportée au quotidien !

Je n'oublie pas, bien entendu, tous ceux qui ont été de passage dans la salle « Stagiaires » : Christelle, Jérémie, Sylvain, Chutima, Alicia, Amine, Elodie, Quam, Nour, William, Benjamin, Sophia, Emma, Alban, Zoé, Muriel et Sylvie. Merci également à « mon » stagiaire, Gérald, de m'avoir aidée à avancer ce travail, et à Roba d'avoir défriché pour moi ce sujet.

Merci à tous ceux qui ont fait que je me suis sentie chez moi à mon arrivée à Montpellier : Pauline, Karine, Aude, Nathalie, Rebecca, Armelle, Annabelle, Isabelle, pour les après-midi à papouiller de la laine en mangeant des pâtisseries, Marie-Pascale, Katia, Andrée, Dominique, pour notre aventure politico-tricotesque, Olive, Fifi, Luc et Lilia pour m'avoir laissé jouer de l'ukulélé, même mal, lors de nos après-midi à la cabane. Une petite pensée également pour une certaine communauté-lélé qui aura représenté pour moi un grand soutien moral durant ces trois années.

Un énorme merci enfin à tous ceux qui sont restés à Strasbourg, en particulier à Laurence et Caro, que je retrouve avec joie à chacune de mes visites, et à toute ma famille : ma maman pour son écoute constante et les heures à refaire le monde, même au téléphone, mon frère pour sa philosophie, et mon père pour son aide précieuse en tous points. Merci à vous pour votre soutien tout au long de ces trois années. J'ai une pensée également pour celle qui m'aura aidée au début de cette aventure, mais ne sera pas restée assez longtemps pour en voir la fin.

Il est difficile, en cette heure de bilan, de revenir sur trois années bien remplies sans oublier personne : ainsi, à tous ceux que j'ai pu oublier : pardon ! Soyez remerciés ici et assurés de ma gratitude.

A vous tous, encore une fois :

Merci !

La plupart des espèces évoluent toutes seules au fil du temps, ainsi que l'a voulu dame Nature. Une méthode parfaitement naturelle, donc, organique, accordée sur les cycles mystérieux du cosmos, lequel estime que rien ne vaut des millions d'années d'essais et d'échecs bien frustrants pour dérouiller une espèce.

« Le Faucheur », Terry Pratchett, 1991, traduit par Patrick Couton.

Table des matières

Introduction bibliographique : les apports de la génomique en bactériologie	1
Préambule : la génomique, l'étude d'une somme de gènes ?	2
I- La structure des génomes bactériens	3
A. L'organisation conservée du chromosome bactérien circulaire	3
1. La réplication du chromosome bactérien circulaire	3
2. L'organisation des gènes sur le chromosome bactérien	3
B. Des structures variables entre les génomes bactériens	4
1. Les régions de plasticité génomique (RGP)	4
2. Les réarrangements intra-chromosomiques	4
3. Les réarrangements inter-chromosomiques : les transferts horizontaux de gènes	5
a. Mécanismes de transfert horizontal	5
b. Les types d'éléments génétiques mobiles	6
i. Plasmides	7
ii. Prophages	7
iii. Ilots génomiques au sens large	8
ICE et IME	9
Ilots génomiques au sens strict	9
Transposons et séquences d'insertion	9
Intégrons	9
c. Combinaisons de MGE	10
d. Evolution des MGE au sein du génome	10
4. Les pseudogènes	10
II- La génomique en taxinomie et phylogénie bactérienne	12
A. Taxinomie et phylogénie phénotypiques	13
1. Définition des espèces bactériennes sur la base du phénotype	13
2. La taxinomie numérique : première tentative de phylogénie	13
B. Taxinomie et phylogénie moléculaires	13
1. Utilisation des gènes de l'ARN 16S	13
2. Utilisation de plusieurs gènes conservés	14
C. Définition génomique de l'espèce bactérienne	15
1. L'utilisation du génome entier pour définir une espèce bactérienne	15
a. Hybridation ADN-ADN	15
b. Average nucleotide identity (ANI)	15
c. La définition polyphasique de l'espèce bactérienne	15

2. Les concepts apportés par la génomique comparative	15
a. L'importance de la variabilité génomique et des transferts horizontaux de gènes	15
b. Core-génome, génome flexible et pan-génome	16
c. Les arbres phylogénétiques fondés sur les core-génomes.....	17
d. Vers l'abandon de la notion d'espèce bactérienne ?	18
i. La vision « optimiste » : l'espèce bactérienne comme clusters de populations	18
ii. La vision « pessimiste » : un continuum de souches bactériennes	18
iii. La taxinomie sans l'espèce.....	19
III- Evolution des génomes bactériens	21
A. Variations cryptiques au sein du génome	21
B. Acquisition de nouvelles fonctions.....	22
1. Acquisition de fonctions par duplication.....	22
2. Acquisition de fonctions par transfert horizontal	22
C. Perte de fonctions et réduction génomique	24
1. Perte de fonctions lors l'adaptation à un milieu	24
a. Relâchement de la pression de sélection sur certains gènes	24
b. Perte de gènes due à une pression de sélection purifiante	24
2. Phénomène de réduction génomique.....	25
a. Réduction génomique par rationalisation	25
b. Réduction génomique par dérive génétique.....	25
IV- Génomique et facteurs de virulence	29
A. Méthodes d'identification des facteurs de virulence	29
1. Les approches de génétique inverse	29
a. Mutagénèse par transposition	29
b. Banque de clones hétérologues	29
2. Suivi de l'expression	30
a. Technologie IVET	30
b. RNA-Seq.....	30
3. Identification de facteurs de virulence par génomique comparative.....	31
a. Comparaisons génomiques via les puces à ADN	31
b. Comparaison de génomes séquencés	31
B. Impact de la génomique sur la notion de facteur de virulence	31
1. Les facteurs de virulence, des variations sur le même thème	32
a. Adhésines.....	32
b. Invasines	32
c. Toxines	32
i. Toxines AB	33
ii. Pore-forming toxins	33

iii. Superantigènes	33
iv. Effecteurs des systèmes de sécrétion.....	33
d. Systèmes de sécrétion.....	34
i. Systèmes de sécrétion de type III	34
ii. Systèmes de sécrétion de type IV.....	34
iii. Système de sécrétion de type V	34
iv. Système de sécrétion de type VI	35
iv. Vésicules de membrane externe	35
e. Les sidérophores.....	35
f. Les régulateurs	35
g. Redondance des facteurs de virulence.....	36
2. Comment définir un facteur de virulence ?	36
Conclusion : la génomique comme science.	38
 Le modèle : les bactéries entomopathogènes du genre <i>Xenorhabdus</i>	40
I- La symbiose némato-bactérienne <i>Steinernema-Xenorhabdus</i>.....	41
II- <i>Xenorhabdus nematophila</i>, un modèle pour le genre <i>Xenorhabdus</i>	41
A. Entrée de <i>X. nematophila</i> dans l'hémolymphe et contournement du système immunitaire ..	41
1. Libération de <i>X. nematophila</i> par <i>S. carpocapsae</i>	41
2. Résistance de la bactérie à l'immunité de l'insecte	42
a. Résistance à l'immunité cellulaire de l'insecte.....	42
b. Résistance à l'immunité humorale de l'insecte	42
i. Résistance aux peptides antimicrobiens	42
ii. Résistance au système phénoloxydase	42
B. Multiplication bactérienne dans l'hémolymphe et mort de l'insecte.....	43
1. Mise en place de la septicémie et formation d'agrégats bactériens	43
2. Sécrétion de toxines	43
C. Dégradation du cadavre de l'insecte.....	43
1. Acquisition des nutriments.....	43
2. Inhibition des compétiteurs	44
D. Réassociation avec le nématode.....	44
E. Régulation du cycle.....	44
III- Un aperçu de la diversité des associations <i>Xenorhabdus-Steinernema</i>	45
A. Phylogénie et spécificité des associations <i>Xenorhabdus-Steinernema</i>	45
B. La virulence des associations <i>Xenorhabdus-Steinernema</i>	45
C. La diversité des génomes chez <i>Xenorhabdus</i>	46
D. La diversité des facteurs de virulence de <i>Xenorhabdus</i>	46
Résultats	47

Chapitre 1 : Description génomique de la souche non-virulente <i>X. poinarii</i> G6	48
I- <i>X. poinarii</i> G6 a subi une réduction génomique (Article 1)	48
II- Les systèmes toxine-antitoxine chez <i>Xenorhabdus</i>	49
A. Introduction	49
B. Matériel et méthodes	49
C. Résultats	50
D. Conclusion	50
III- Conclusion du chapitre 1	51
Chapitre 2. Caractérisation des interactions <i>Steinernema-Xenorhabdus bovienii</i>	52
I- Introduction	52
II- Efficacité du parasitisme par les associations <i>Steinernema</i> sp.-<i>Xb</i> et mesure de la virulence de la bactérie <i>Xb</i> seule (Article 2)	52
III- Efficacité du parasitisme par les <i>Steinernema</i> aposymbiotiques	53
A. Matériel et méthodes	53
1. Obtention des nématodes aposymbiotiques	53
2. Vérification de l'absence de symbionte chez les <i>Steinernema</i> traités	53
3. Mesure de la virulence des nématodes aposymbiotiques	53
B. Résultats	53
1. Les nématodes <i>S. jolietii</i> restent contaminés par leur symbionte	53
2. Virulence des <i>Steinernema</i> aposymbiotiques sur les larves de <i>S. littoralis</i>	54
3. Reproduction du nématode	54
a. Succès parasitaire	54
b. Succès reproducteur	54
c. Dégradation du cadavre des larves de <i>S. littoralis</i>	55
4. Discussion et conclusion	55
IV- Conclusion du chapitre II : des interactions <i>Steinernema-Xb</i> plus ou moins fortes	56
Chapitre 3 : Description génomique de la souche non-virulente <i>X. bovienii</i> CS03 (Article 3)	57
Conclusion du chapitre III	58
Chapitre 4 : Recherche de nouveaux facteurs de virulence chez <i>Xenorhabdus</i> par génomique comparative et fonctionnelle	59
I- Introduction	59
II- Matériel et méthodes	59
A. Identification des gènes de virulence potentiels	59
B. Validation fonctionnelle	60

1. Clonage des gènes candidats dans le plasmide pBBR1-MCS2 et conjugaison dans <i>Xb</i> CS03 et <i>Xp</i> G6	60
2. Tests phénotypiques et biochimiques.....	60
3. Vérification de l'expression constitutive des inserts dans les transconjugants	61
4. Recherche d'une activité hémolytique en milieu liquide.....	61
5. Recherche d'une activité protéolytique	61
6. Surproduction de la protéine codée par XNC1_2096	62
7. Tests pathologiques.....	62
8. Interaction avec les hémocytes de <i>S. littoralis</i>	62
9. Effet des bactéries recombinantes sur l'émergence du nématode	62
III- Résultats	63
A. Identification de gènes de virulence par comparaison génomique.....	63
B. Clonage des gènes candidats	64
C. Criblage fonctionnel des souches recombinantes	64
D. Le locus <i>xaxAB</i>	65
1. Contexte génomique du locus <i>xaxAB</i>	65
2. Complémentation de l'activité hémolytique dans <i>Xb</i> CS03 et <i>Xp</i> G6	65
3. Absence de complémentation de l'activité cytolytique par <i>xaxAB</i> dans <i>Xb</i> CS03	66
4. <i>Xb</i> CS03 pBB- <i>xaxAB</i> n'a pas d'effet sur la pathologie et la fitness de <i>S. weiseri</i>	66
D. Le gène XNC1_2096	66
1. Contexte génomique du gène XNC1_2096	66
2. Prédiction structurale de la protéine codée par XNC1_2096.....	67
3. Absence d'activité protéasique directe.....	67
IV- Conclusion du chapitre 4	68
Discussion et perspectives	70
Références bibliographiques	75
Annexes	104

Liste des figures et tableaux non intégrés aux articles

Figures

Figure 1. La réplication du chromosome circulaire bactérien.

Figure 2. Répartition des gènes sur le chromosome circulaire bactérien.

Figure 3. Régions de plasticité génomique.

Figure 4. Mécanismes entraînant des différences structurales entre les génomes.

Figure 5. Core-génome, génomes flexibles et pan-génome.

Figure 6. Transferts horizontaux, clusters de populations et espèce bactérienne.

Figure 7. Les mécanismes de la réduction génomique.

Figure 8. Processus de réduction génomique par dérive génétique.

Figure 9. Cycle de vie du couple *Steinernema-Xenorhabdus*.

Figure 10. Phylogénie et virulence comparée des souches de *Xenorhabdus*.

Figure 11. Système toxine-antitoxine de type II (Schuster & Bertram, 2013).

Figure 12. Recherche du symbionte *Xenorhabdus* chez les nématodes traités et non traités par les antibiotiques.

Figure 13. Taux de mortalité induit par les souches sauvages et aposymbiotiques de *S. weiseri* (A) et *S. jolietii* (B) chez *S. littoralis*.

Figure 14. Succès parasitaire des souches sauvages et aposymbiotiques de *S. weiseri* (A) et *S. jolietii* (B) chez *S. littoralis*.

Figure 15. Succès reproducteur des souches sauvages et aposymbiotiques de *S. weiseri* (A) et *S. jolietii* (B) chez *S. littoralis*.

Figure 16. L'intestin de larves de *S. littoralis* infestées par les souches de *S. weiseri* sauvage (A) et aposymbiotique (B) 4 jours post-mortem.

Figure 17. Comparaison des loci *xaxAB* au sein des souches virulentes et non-virulentes.

Figure 18. Activité hémolytique observée suite à l'introduction de *xaxAB* chez *Xb* CS03 et *Xp* G6. (A)*Xb* CS03 pBBR1_MCS2 ; (B)*Xp* G6-pBBR1-MCS2 ; (C) *Xb* CS03/pBB-*xaxAB* ; (D)*Xp* G6/pBB-*xaxAB*.

Figure 19. Effet des transconjugants sur les hémocytes de *S. littoralis*.

Figure 20. Contexte génomique du gène XNC1_2096 et de ses homologues chez *Xenorhabdus*.

Figure 21. Arbre phylogénétique des homologues de XNC1_2096.

Figure 22. Activité gélatinase de *Xb* CS03 pBBR1-MCS2(A) et *Xb* CS03 pBB-XNC1_2096(B) après une incubation de 72h à 28°C en galerie API.

Figure 23. Activité caséinolytique de cultures entières (24h de croissance) des transconjugants *Xb* CS03/pBBR1-MCS2 et *Xb* CS03/pBB-2096.

Figure 24. Activité gélatinase des surnageants et des extraits cellulaires des transconjugants.

Tableaux

Tableau 1. Loci TA chez *Xenorhabdus*.

Tableau 2. Gènes identifiés lors de l'analyse Phyloprofile absents chez les souches non-virulentes et présents chez les souches virulentes.

Tableau 3. Phénotypes des transconjugants *Xb* CS03.

Tableau 4. Phénotypes des transconjugants *Xp* G6.

Tableau 5. Activité hémolytique des surnageants de culture des transconjugants pBBR1-MCS2 et pBB-*xax* de *Xb* CS03 et *Xp* G6.

Annexes

Tableau annexe 1. Amorces et enzymes de restriction utilisées pour le clonage des facteurs de virulence potentiels dans le pBBR1-MCS2.

Tableau annexe 2. Souches et plasmides utilisés dans le clonage des facteurs de virulence potentiels de *Xenorhabdus*.

Liste des abréviations utilisées

IJ	<i>Infective juvenile</i>
LPS	lipopolysaccharide
MGE	<i>Mobile genetic element</i>
PAI	<i>Pathogenicity island</i>
PFT	<i>pore-forming toxin</i>
RGP	Région de plasticité génomique
<i>sp.</i>	<i>Species</i>
TA	Toxine-antitoxine
T(X)SS	<i>Type (X) secretion system</i>
<i>Xb</i>	<i>Xenorhabdus bovienii</i>
<i>Xp</i>	<i>Xenorhabdus poinarii</i>

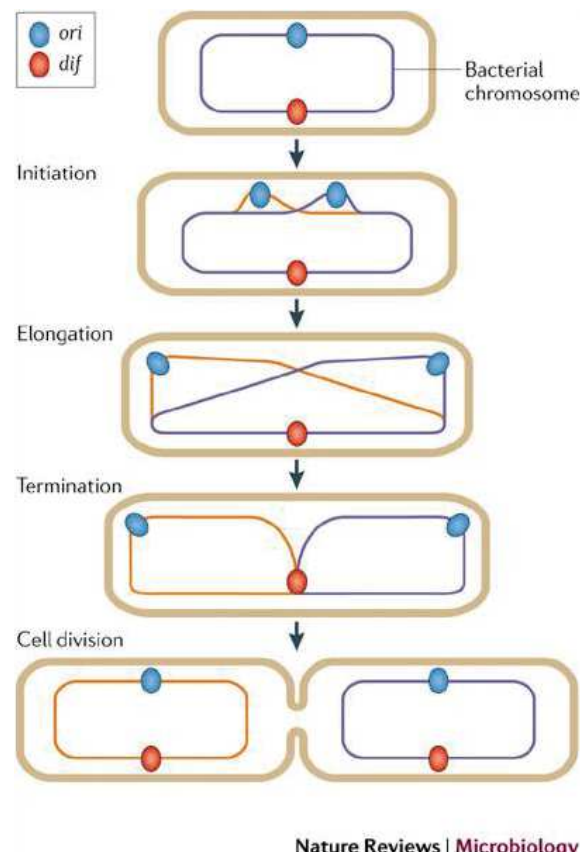
Introduction bibliographique : les apports de la génomique en bactériologie

Préambule : la génomique, l'étude d'une somme de gènes ?

Le premier génome bactérien complet, celui d'*Haemophilus influenzae*, a été séquencé il y a presque 20 ans (Fleischmann *et al.*, 1995), rendant possible l'étude de génomes dans leur intégralité et marquant ainsi l'entrée dans l'ère de la génomique. Depuis, 3022 génomes bactériens ont été publiés, et 38 787 projets de séquençage sont listés par la base GOLD (*Genomes OnLine Database*, www.genomesonline.org; chiffres du 26/09/2014). Cette accumulation exponentielle de séquences a permis la comparaison de génomes d'organismes plus ou moins proches, afin de comprendre l'évolution bactérienne.

Les premières comparaisons génomiques sont marquées par une approche « gène-centrée ». En effet, selon la théorie du gène égoïste posée par Dawkins (1976), ce sont les gènes individuels qui sont l'objet de la sélection lors de l'évolution, et le génome n'est que la somme de ces gènes. La génomique est donc d'abord considérée comme un ensemble de techniques permettant le séquençage et l'annotation de gènes, afin d'étudier ces sommes de gènes que constituent les génomes. Les comparaisons génomiques permettent alors d'isoler des ensembles de gènes communs ou différents entre les organismes comparés (Koonin & Galperin, 1997). Ainsi, la première comparaison génomique, réalisée entre les deux premiers génomes bactériens séquencés, *H. influenzae* et *Mycoplasma genitalium*, sépare le contenu génétique commun aux deux organismes des gènes présents dans une seule des deux espèces, responsables de leurs différences métaboliques (Fraser *et al.*, 1995).

Cependant, avec l'augmentation du nombre de comparaisons génomiques, la vision du génome bactérien comme une simple somme de gènes se transforme. Dans cette introduction, nous nous intéresserons aux notions apportées par la génomique dans la compréhension des Eubactéries.



Nature Reviews | Microbiology

Figure 1. La réplication du chromosome circulaire bactérien (Touzain *et al.*, 2011). La réplication débute au site *ori*. Les deux fourches de réplication progressent ensuite de façon bidirectionnelle vers le site *dif*, ce qui entraîne la séparation du chromosome en deux réplichores égaux.

I- La structure des génomes bactériens

A. L'organisation conservée du chromosome bactérien circulaire

Borrelia burgdoferi, *Agrobacterium tumefaciens* et *Streptomyces coelicolor* possèdent des chromosomes linéaires (Bentley *et al.*, 2002; Fraser *et al.*, 1997; Wood *et al.*, 2001). Cependant, la grande majorité des chromosomes bactériens sont circulaires; nous nous concentrerons donc sur la réplication, l'architecture et l'organisation des gènes du chromosome bactérien circulaire.

1. La réplication du chromosome bactérien circulaire

La découverte de la structure thêta du chromosome d'*Escherichia coli* (Cairns, 1963) a permis de comprendre le mécanisme de réplication des chromosomes bactériens circulaires (Figure 1). Lors de l'initiation de la réplication, la protéine DnaA se lie à l'ADN au niveau d'un site spécialisé, appelé « *ori* ». Cette liaison permet de recruter la machinerie de réplication. Il se forme alors deux fourches de réplication qui progressent dans des directions opposées, chacune synthétisant un brin direct de façon continue, et un brin retardé de façon discontinue. La réplication se termine avec la rencontre des deux fourches de réplication au niveau du site *dif* (Hendrickson & Lawrence, 2007) et la résolution éventuelle du dimère de chromosomes par recombinaison.

2. L'organisation des gènes sur le chromosome bactérien

Du fait de la réplication bidirectionnelle du chromosome circulaire bactérien, l'axe *ori-dif* sépare le chromosome en deux moitiés, les réplichores (Rocha, 2008). Les mécanismes de synthèse, et donc les mutations les plus fréquentes, diffèrent entre les brins continu et discontinu (Kowalczyk *et al.*, 2001). Ceci entraîne l'apparition de biais de GC différents entre ces deux brins (Lobry & Louarn, 2003). Au niveau du site *dif*, là où les deux fourches de réplication se rencontrent, le biais de GC s'inverse (Lobry, 1996).

Le mécanisme de réplication bidirectionnelle influence fortement la répartition des gènes sur le chromosome (Rocha, 2004b). Chez une bactérie à croissance rapide, un deuxième cycle de réplication du chromosome peut débuter sans que le premier ne soit terminé, ce qui entraîne une surreprésentation des gènes situés à proximité de l'origine de réplication. Il a été observé que les gènes fortement sollicités durant la croissance bactérienne sont proches d'*ori*, ce qui pourrait être une adaptation de la structure chromosomique pour augmenter le dosage de leur expression (Figure 2; Couturier & Rocha, 2006).

De la même façon, les gènes essentiels se retrouvent préférentiellement sur le brin précoce (à réplication directe). En effet, lorsqu'une même région génomique est répliquée et transcrite simultanément, les collisions entre l'ADN polymérase et l'ARN polymérase sont fréquentes. Cependant, la transcription sera plus souvent interrompue si les deux enzymes entrent en collision frontale, sur le brin retardé (l'ADN polymérase synthétise alors les fragments d'Okazaki dans le sens

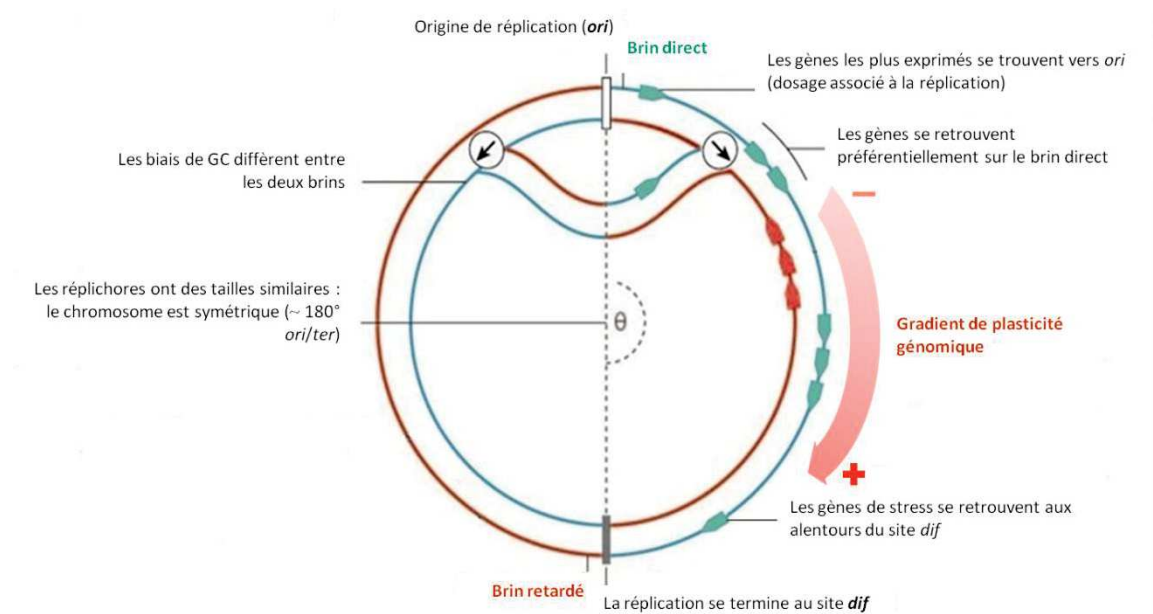


Figure 2. Répartition des gènes sur le chromosome circulaire bactérien (Rocha, 2008; Abby & Daubin, 2007). Le mécanisme de répllication influence la répartition des gènes sur le chromosome.

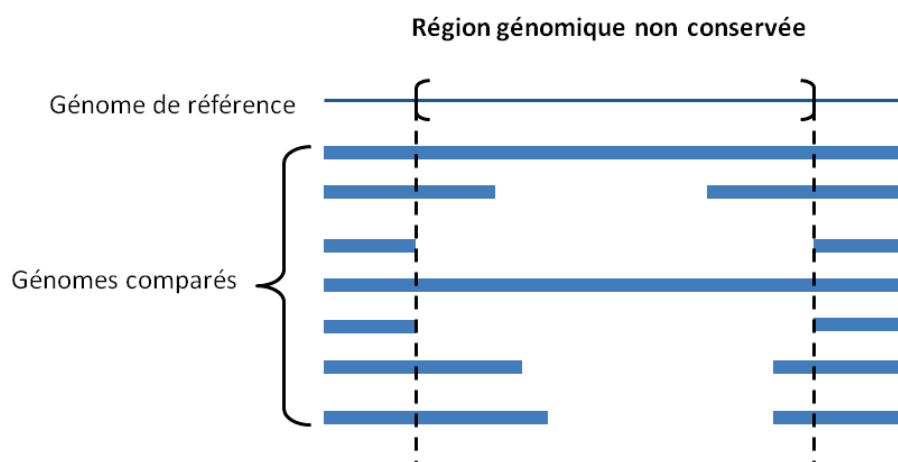


Figure 3. Régions de plasticité génomique (d'après Ogier *et al.*, 2010).

opposé à la transcription par la RNA polymérase). L'interruption fréquente de la transcription d'un gène essentiel qui serait placé sur le brin retardé mène donc à la contre-sélection de cette position (Rocha & Danchin, 2003). Les gènes impliqués dans la résistance au stress sont en revanche situés autour du site *dif* (Rocha *et al.*, 2003). Ces données suggèrent que le chromosome bactérien est organisé afin de maximiser l'efficacité de la réplication et de l'expression des gènes. Cependant, cette organisation doit aussi permettre la flexibilité génomique, qui est le moteur de l'évolution (Rocha, 2004a). La plasticité génomique semble se localiser au niveau de certains « hotspots » : les alentours du site de terminaison de la réplication (Daubin & Perrière, 2003; Suyama & Bork, 2001) ; les plasmides, comme chez *Borrelia burgdorferi* (Casjens *et al.*, 2000) ; ou des zones de plasticité comme chez *Helicobacter pylori* (Alm *et al.*, 1999) ou la bactérie marine *Pirellula* sp. (Glöckner *et al.*, 2003). Au contraire, au niveau du site *ori*, où s'accumulent un grand nombre de gènes essentiels, tout réarrangement est contre-sélectionné. Il se forme alors un gradient de plasticité génomique qui suit l'axe *ori-dif* (Abby & Daubin, 2007; Daubin & Perrière, 2003).

Les comparaisons génomiques ont montré la conservation de cette organisation générale du chromosome circulaire, même entre des espèces éloignées comme *E. coli* et *Bacillus subtilis* (Touzain *et al.*, 2011; Hendrickson & Lawrence, 2007; Abby & Daubin, 2007).

B. Des structures variables entre les génomes bactériens

1. Les régions de plasticité génomique (RGP)

Les comparaisons génomiques mettent en évidence des ruptures de synténie entre les génomes bactériens. Ainsi, certains segments d'ADN vont être présents dans certains génomes utilisés dans la comparaison, et pas dans d'autres (Figure 3). Mathee *et al.* (2008) ont été les premiers à définir ce concept de « régions de plasticité génomique » (RGP), comme suit :

- Les RGP sont des régions où la synténie est rompue sur au moins 4 phases ouvertes de lecture (ORF, *open reading frames*) contiguës.
- Les RGP sont absentes d'au moins l'un des génomes comparés.
- On ne présume pas de l'origine des RGP : elles peuvent être gagnées par les souches où elles sont présentes ou perdues par les souches où elles sont absentes.

Les RGP peuvent être dues à des réarrangements intra-chromosomiques ou inter-chromosomiques (Figure 4); le paragraphe qui suit explore ces deux cas de figure.

2. Les réarrangements intra-chromosomiques

Au sein des génomes, il existe divers types de réarrangements conduisant au déplacement, au gain ou à la perte de régions chromosomiques (Figure 4). Ces réarrangements sont possibles grâce à la recombinaison entre des séquences d'ADN répétées directement (orientées dans le même sens),

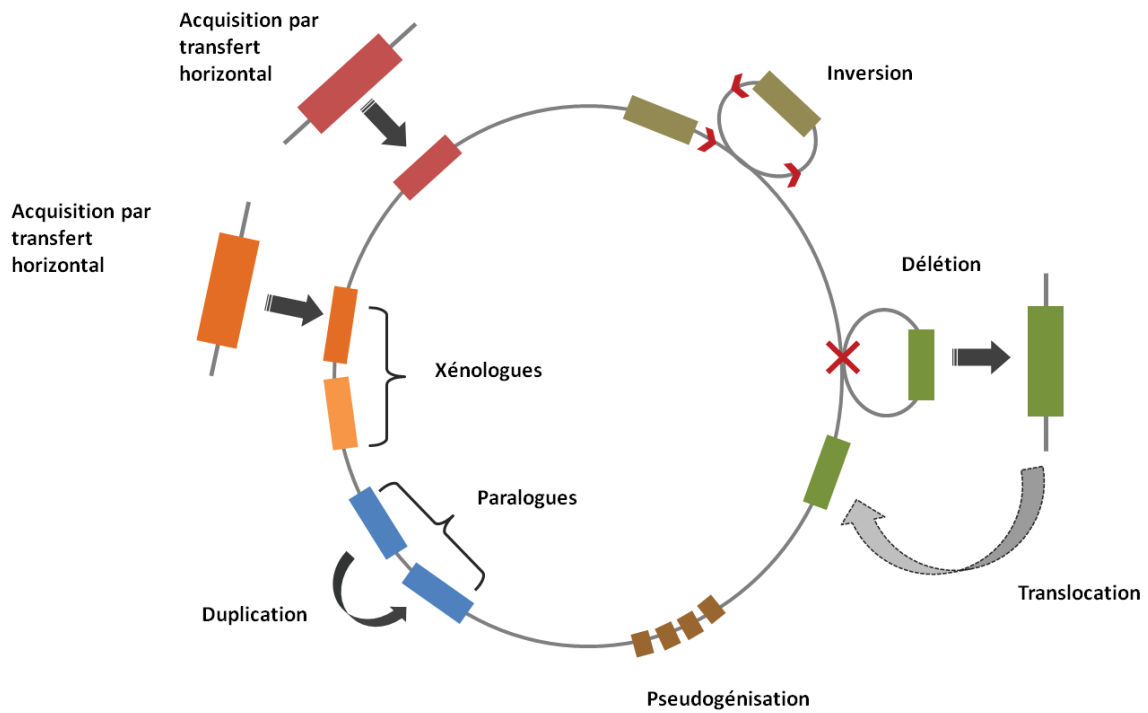


Figure 4. Mécanismes entraînant des différences structurales entre génomes proches (Abby & Daubin, 2007). Les réarrangements intra- et inter-chromosomiques montrés dans cette figure mènent à l'apparition de RGP (régions de plasticité génomique) lors de la comparaison de génomes bactériens proches. Les réarrangements intra-chromosomiques mènent au gain (duplication), à la perte (délétion) ou au déplacement (inversion, translocation) de régions génomiques. Les transferts horizontaux de gènes sont des réarrangements inter-chromosomiques (mettant en jeu les génomes de deux bactéries différentes) menant au gain de régions génomiques. Le pseudogénéisation est l'inactivation et la perte lente d'un gène.

comme par exemple les opérons *rrn*, qui codent les ARN ribosomaux (Helm *et al.*, 2003), ou inversées (Hughes, 2000).

- La duplication d'une région chromosomique a lieu lors de la recombinaison entre deux séquences directement répétées et génère deux copies d'un gène. L'une des deux copies peut ensuite diverger par accumulation de mutations.
- La recombinaison entre deux séquences directement répétées peut également entraîner la formation d'un ADN circulaire transitoire. Dans le cas d'une délétion, l'ADN transitoire est perdu. Cependant, une recombinaison de cet ADN transitoire avec une nouvelle région entraîne une translocation.
- Lors de la recombinaison entre deux séquences inversement répétées, on assiste à une inversion de régions chromosomiques.

Les réarrangements chromosomiques peuvent être plus ou moins larges. Cependant, ils respectent le plus souvent l'axe *ori-dif*. En effet, toute différence de taille importante entre les réplichoires est délétère pour la bactérie (Esnault *et al.*, 2007; Rocha, 2004a).

3. Les réarrangements inter-chromosomiques : les transferts horizontaux de gènes

Les RGP peuvent également être le résultat de transferts horizontaux de gènes entre procaryotes, avec pour résultat un réarrangement inter-chromosomique. Les RGP issues d'un transfert horizontal sont en général reconnaissables car fortement structurées.

a. Mécanismes de transfert horizontal

Les bactéries intègrent fréquemment de l'ADN étranger dans leurs génomes. L'ADN exogène peut entrer dans une cellule grâce à différents mécanismes :

- La transformation est la capture d'ADN double-brin étranger, issu de l'environnement de la bactérie, par un pilus spécifique, suivie de son internalisation sous forme simple-brin. Les gènes impliqués dans la liaison et l'internalisation de l'ADN exogène (*pilDEFG*, *comEA* chez le modèle Gram-négatif *Neisseria gonorrhoeae*) ne sont exprimés que si la bactérie est dite « compétente ». Cet état de compétence est induit par divers stress : carence nutritionnelle, forte densité bactérienne, dommages à l'ADN ou présence d'antibiotiques dans le milieu. Il a donc été proposé que l'acquisition de nouveaux gènes permette la résistance aux stress ou que l'ADN exogène est utilisé pour réparer le génome endommagé (Claverys & Martin, 2003; Johnston *et al.*, 2014).

- La transduction est l'intégration d'ADN étranger apporté par un bactériophage. Lors de la multiplication du bactériophage, il arrive qu'un fragment d'ADN de la cellule hôte soit encapsidé. Lors de l'infection d'une cellule receveuse par ce bactériophage transformant, l'ADN exogène pourra s'intégrer en même temps que le reste du génome du prophage, lors d'un cycle lysogénique (Brussow *et al.*, 2004).
- La conjugaison est la transmission d'ADN d'une cellule donneuse à une cellule receveuse. Ce mécanisme a d'abord été décrit dans le cadre de transferts de plasmides dits "conjugatifs" entre bactéries *E. coli*. Ces transferts nécessitent un locus appelé *tra*, lui-même présent sur le plasmide conjugatif (Arutyunov & Frost, 2013). Chez les bactéries Gram-négatives, la conjugaison nécessite en réalité deux complexes : le relaxosome (composé de la relaxase Mob et de protéines accessoires), qui lie l'ADN à transférer au niveau du site *oriT* (origine de transfert) et le transforme en ADN simple-brin linéaire, et un système de sécrétion de type IV (T4SS, codé par les gènes *virB*₁₋₁₁ chez le modèle *A. tumefaciens*; *virB4* ou *traU* codent une ATPase très conservée). Les deux complexes sont reliés par une T4CP (*Type 4 coupling protein*, VirD4 ou TcpA) (De La Cruz *et al.*, 2010; Guglielmini *et al.*, 2013). Les éléments conjugatifs ne sont pas forcément des plasmides, et les gènes codant le T4SS ne sont pas forcément couplés à l'ADN transféré (voir plus bas).
- L'ADN étranger peut également être transmis par des vésicules de membrane externe (Renelli *et al.*, 2004; Rumbo *et al.*, 2011) ou des nanotubes reliant cellule donneuse et receveuse (Dubey & Ben-Yehuda, 2011).

A l'exception des plasmides, qui sont réplcatifs, l'ADN acquis par transfert horizontal doit s'intégrer au génome receveur pour persister. L'intégration de la nouvelle séquence se fait classiquement par une recombinaison homologue, assurée par la recombinaison RecA, au niveau d'une séquence conservée (65-75% d'identité sur 25-200 pb) entre l'ADN donneur et l'ADN receveur (Thomas & Nielsen, 2005). Les gènes d'ARN de transfert, conservés parmi les espèces et présents en plusieurs copies au sein du génome, sont des sites d'intégration privilégiés (Groisman & Ochman, 1996). L'intégration de l'ADN exogène dans le génome peut également, plus rarement, se faire par recombinaison hétérologue entre des séquences de 3 à 8 pb (Thomas & Nielsen, 2005; de Vries & Wackernagel, 2002).

b. Les types d'éléments génétiques mobiles

Les séquences d'ADN capables de passer d'un génome bactérien à l'autre par transfert horizontal sont regroupées sous le terme d'éléments génétiques mobiles (MGE, *mobile genetic elements*). Parmi ces MGE, on trouve les plasmides, qui sont auto-réplcatifs, et plusieurs types d'éléments transposables intégrés au génome bactérien (Dobrindt *et al.*, 2004; Roberts *et al.*, 2008).

i. Plasmides

Les plasmides sont des molécules d'ADN circulaires auto-réplicatives, qui forment donc des réplicons indépendants du chromosome bactérien (Dobrindt *et al.*, 2004; Thomas & Summers, 2001). Le plasmide étant autonome par rapport au chromosome, il comprend les gènes permettant sa réplication et, éventuellement, sa transmission par conjugaison, qui forment un « squelette plasmidique » conservé. Les gènes permettant l'adaptation de l'hôte à son environnement, en revanche, sont eux beaucoup plus variables et s'organisent en modules assurant une fonction (Garcillán-Barcia *et al.*, 2011; Norman *et al.*, 2009; Thomas, 2000).

Les plasmides confèrent à leurs hôtes diverses propriétés adaptatives. Ainsi, au sein du genre *Bacillus*, la bactérie hautement pathogène *B. anthracis*, le pathogène opportuniste *B. cereus* et le pathogène d'insecte *B. thuringiensis* sont génétiquement proches, et leurs phénotypes très variés sont dus au contenu de leurs plasmides respectifs (Helgason *et al.*, 2000). Par exemple, chez *B. anthracis*, le plasmide pXO1 code les toxines nécessaires à l'établissement de la maladie du charbon (Okinaka *et al.*, 1999). Chez les bactéries symbiotiques du genre *Rhizobium*, la possibilité d'établir une symbiose fixatrice d'azote avec une légumineuse est due à la présence du plasmide pSym, qui porte les gènes permettant la nodulation et l'utilisation de l'azote atmosphérique (Freiberg *et al.*, 1997). La transmission de plasmides est également responsable de la propagation rapide de la résistance aux antibiotiques parmi les bactéries responsables d'infections nosocomiales (Carattoli, 2013).

ii. Prophages

Les bactériophages sont les virus spécifiques des procaryotes, et peuvent avoir divers effets sur les génomes bactériens. Les bactériophages sont tout d'abord impliqués dans le transfert horizontal de gènes : en effet, la lyse d'une bactérie par un bactériophage entraîne la libération d'ADN dans l'environnement, où il est disponible pour transformer des bactéries compétentes (Brussow *et al.*, 2004; Fortier & Sekulovic, 2013). Les bactériophages sont également les agents de la transduction (voir I.B.3.a.).

En plus de leur cycle lytique, les phages peuvent avoir un cycle lysogénique. Dans ce cas, le génome phagique s'intègre dans le génome bactérien sous forme de prophage et reste quiescent (Fortier & Sekulovic, 2013). De nombreux prophages sont ainsi intégrés aux génomes procaryotes et sont des agents majeurs de leur adaptation. L'intégration d'un prophage peut ainsi interrompre un gène ou le déréguler (Fortier & Sekulovic, 2013). Par exemple, chez certaines souches de *Staphylococcus aureus*, le gène d'hémolysine *hly* est interrompu par un prophage, rendant ces souches moins virulentes lors des infections cutanées (Coleman *et al.*, 1991; Katayama *et al.*, 2013).

Chez *E. coli*, l'insertion d'un prophage dans le gène *mlrA*, qui code un activateur de transcription, réduit la production de *curli* adhésifs et de biofilm (Uhlich *et al.*, 2013).

L'insertion de prophages peut entraîner des réarrangements génomiques (Brussow *et al.*, 2004; Okinaka *et al.*, 2011). Lors d'un stress, le prophage peut être excisé et le bactériophage reprend alors un cycle lytique, ce qui peut entraîner le transfert de gènes par transduction. Ainsi, chez *Staphylococcus aureus*, un traitement antibiotique entraînant l'excision des prophages augmente la dissémination des gènes de virulence dans la population (Ubeda *et al.*, 2005).

Enfin, les prophages portent eux-mêmes des facteurs de virulence. De nombreuses toxines, comme la toxine diphtérique de *Corynebacterium diphtheriae*, la neurotoxine de *Clostridium botulinum* ou la toxine cholérique de *Vibrio cholerae* sont codées par des prophages (Brussow *et al.*, 2004). Les prophages contiennent également d'autres facteurs de virulence, comme des adhésines, des régulateurs, des protéases ou des facteurs de résistance au sérum (Fortier & Sekulovic, 2013; Brussow *et al.*, 2004). Enfin, la sécrétion de bactériocines ayant une structure de queue de phage permet d'éliminer les bactéries compétitrices dans l'environnement (Brussow *et al.*, 2004; Strauch *et al.*, 2001).

iii. Ilots génomiques au sens large

Le terme d'« ilot génomique » a tout d'abord été proposé pour désigner, au sein des génomes bactériens, des RGP reconnaissables grâce à plusieurs caractéristiques structurales (Hacker & Carniel, 2001; Hacker *et al.*, 1997) :

- Leur taille est comprise entre 10 et 200 kb.
- Leur GC% et leur biais de codons divergent souvent de ceux du reste du génome.
- A cause de leur insertion par recombinaison homologue au sein du génome, les ilots génomiques sont flanqués de séquences répétées. Ils s'insèrent souvent au niveau des gènes d'ARN de transfert.
- Les ilots génomiques contiennent des éléments de mobilité, comme des gènes codant des transposases ou des intégrases.

Les ilots génomiques contiennent des gènes d'adaptation organisés en modules fonctionnels (Ogier *et al.*, 2010). Ces gènes ont des fonctions très variées. Selon les fonctions apportées, ils sont qualifiés d'« ilots de pathogénicité » (PAI, *pathogenicity islands*), qui contiennent des facteurs de virulence, d'« ilots de symbiose » (SAI, *symbiosis islands*), ou d'« ilots écologiques » (ECI, *ecological islands*), qui permettent l'adaptation à de nouveaux environnements (Hacker & Carniel, 2001; Dobrindt *et al.*, 2004).

Actuellement, les structures génomiques qui avaient été désignées comme « ilots génomiques » par Hacker & Carniel (2001) sont divisées en plusieurs classes de MGE non-réplicatifs, issus du transfert horizontal et intégrés par recombinaison dans le génome (Dobrindt *et al.*, 2004) : les éléments transposables (transposons, séquences d'insertion, ICE et IME) et les intégrons (Roberts *et al.*, 2008).

ICE et IME

Les ICE (*integrative conjugative elements*) et les IME (*integrative mobilizable elements*) sont des éléments transposables ubiquitaires dans les génomes bactériens (Guglielmini *et al.*, 2011). Les ICE et les IME sont capables de s'intégrer et de s'exciser du génome bactérien de façon autonome, et de se transmettre par conjugaison. Tout comme les plasmides conjuguatifs, les ICE codent leur propre machinerie de conjugaison, un T4SS, qui est transmis à la bactérie receveuse. Dans le cas des IME, la machinerie de conjugaison n'est pas codée par l'ADN transféré, mais ailleurs dans le génome bactérien; les IME dépendent donc des T4SS déjà présents dans les bactéries donneuses pour leur transmission (Guglielmini *et al.*, 2011; Roberts *et al.*, 2008). Au contraire des plasmides, les ICE et les IME n'existent pas en tant que réplicon circulaire autonome (Wozniak & Waldor, 2010; Guglielmini *et al.*, 2011).

Ilots génomiques au sens strict

Les ilots génomiques au sens strict désignent des RGP issues d'un transfert horizontal et contenant des gènes d'adaptation, mais pas de gènes de mobilisation ou de conjugaison. Ces ilots génomiques « *sensu stricto* » peuvent donc être des ICE et des IME ayant perdu les gènes permettant leur auto-mobilisation (Dobrindt *et al.*, 2004; Binnewies *et al.*, 2006; Roberts *et al.*, 2008).

Transposons et séquences d'insertion

Les transposons sont des éléments génétiques mobiles, capables de s'exciser et de se réinsérer à une localisation différente. Ils se composent d'un gène de transposase, qui catalyse l'évènement de transposition, et de gènes d'adaptation. Les séquences d'insertion (**IS**, *insertion sequence*), quant à elles, ne contiennent qu'une transposase, mais peuvent mobiliser d'autres éléments génomiques pendant leur excision (Binnewies *et al.*, 2006; Dobrindt *et al.*, 2004).

Intégrons

Les intégrons sont des plateformes de recombinaison qui incorporent des gènes exogènes d'origines différentes et permettent leur expression au sein du génome hôte grâce à un promoteur fort. Les intégrons peuvent être associés à des éléments génétiques mobiles, et ainsi se disséminer au sein d'une population (Dobrindt *et al.*, 2004; Mazel, 2006).

c. Combinaisons de MGE

Les MGE peuvent se combiner les uns avec les autres à la manière de poupées russes (Norman *et al.*, 2009; Bellanger *et al.*, 2014). Dans ce cas, un MGE nouvellement acquis s'intègre au sein d'un MGE déjà présent dans le génome ; lors d'une éventuelle remobilisation, c'est la combinaison des deux MGE qui sera transmise. Un autre mécanisme est l'intégration successive de plusieurs MGE à un même endroit du génome, qui a lieu lorsque les deux MGE s'intègrent au niveau d'un même site. On obtient alors des îlots génomiques en tandem, qui peuvent subir des réarrangements par la suite (Bellanger *et al.*, 2014). A cause de ces réarrangements, lors de la comparaison de différents génomes, des RGP peuvent contenir les mêmes modules, mais dans des ordres différents (Ogier *et al.*, 2010).

d. Evolution des MGE au sein du génome

Après leur arrivée dans le génome d'une nouvelle bactérie, les MGE subissent des transformations graduelles qui lissent leurs différences structurales avec le reste du génome receveur. Ainsi, les structures ayant permis l'intégration (gènes d'intégrases, machinerie de conjugaison) peuvent être perdues ; seuls les clusters ayant apporté un avantage évolutif sont conservés (Bellanger *et al.*, 2014). Le biais de codon et le GC% des structures nouvellement intégrées se rapproche progressivement de celui du reste du génome (Kuo & Ochman, 2009; Lawrence & Ochman, 1997; Marri & Golding, 2008). Ainsi, un MGE ancien n'est détectable que sur la base des comparaisons génomiques entre différentes souches bactériennes mettant en évidence les RGP.

4. Les pseudogènes

Le terme de « pseudogène » désigne un gène non fonctionnel pour diverses raisons, comme l'insertion d'ADN interrompant la séquence codante, la délétion d'une partie du gène, l'apparition de mutations non-sens ou d'un décalage du cadre de lecture (*frameshift*) entraînant un arrêt prématuré de la traduction du gène, mais aussi de mutations inactivant l'activité de la protéine (Lerat & Ochman, 2004; Lerat & Ochman, 2005). Les pseudogènes sont couramment détectés sur la base de comparaisons avec leurs homologues appartenant à des souches proches (Lerat & Ochman, 2004; Gil & Latorre, 2012). Cependant, si ces comparaisons génomiques permettent de détecter des insertions, délétions et mutations entraînant une pseudogénisation, elles ne donnent pas accès aux gènes codant des protéines non fonctionnelles. De plus, la variabilité de la longueur d'environ 10% entre des gènes homologues (Lerat & Ochman, 2005), et la divergence entre souches comparées rend la détection des pseudogènes difficile.

Si certains mécanismes permettent de rendre leur fonctionnalité à des pseudogènes, comme chez *Salmonella* où la redéfinition de codons et un mécanisme de décalage du cadre de lecture programmé permettent de traduire des gènes contenant des codons non-sens (Feng *et al.*, 2012), la grande majorité des pseudogènes semble rapidement perdue après leur inactivation (Kuo & Ochman, 2009).

Conclusion

La structure des génomes bactériens est fortement influencée par la réplication, et les grands principes d'organisation du chromosome bactérien circulaire sont conservés parmi les bactéries, même très éloignées phylogénétiquement. Cependant, les comparaisons génomiques entre différentes souches bactériennes montrent que cette organisation stricte est sans cesse perturbée par les réarrangements génomiques et les transferts horizontaux de gènes, qui entraînent une grande plasticité génomique. Au sein des génomes bactériens, il existe donc une balance entre l'efficacité de la réplication et de la transcription d'un côté, et la nécessité d'acquérir de nouvelles fonctions permettant l'adaptation de l'autre.

II- La génomique en taxinomie et phylogénie bactérienne.

Ce chapitre traitera de l'impact de la génomique sur deux sciences : la taxinomie, qui est la science de la classification des êtres vivants en groupes sur la base de leurs similarités ; et la phylogénie, qui est quant à elle la science permettant d'établir les relations évolutives entre ces groupes (Vandamme *et al.*, 1996; Lecointre & Le Guyader, 2006).

L'unité de base en taxinomie est l'espèce (Lecointre & Le Guyader, 2006). Une espèce se définit comme un cluster d'individus cohérent génétiquement et phénotypiquement. En taxinomie, la notion d'espèce se révèle utile dans l'identification d'individus, par exemple pour séparer des individus appartenant à une espèce reconnue comme pathogène d'individus inoffensifs. En phylogénie, la comparaison des espèces, la construction d'arbres et l'estimation du temps passé depuis la divergence d'espèces différentes permet de comprendre les mécanismes de l'évolution (Wayne *et al.*, 1988).

La définition de l'espèce la plus fréquemment utilisée est celle posée par Mayr (Mayr, 1942; Mayr, 1996) : « *Species are groups of actually or potentially interbreeding natural populations, which are isolated from other such groups* ».

Cette définition comprend deux critères :

- Deux individus appartenant à une même espèce peuvent se reproduire entre eux et engendrent une descendance viable et féconde.
- Les individus appartenant à une espèce sont donc isolés reproductivement de ceux d'une espèce différente.

Or, il est difficile d'utiliser ces critères dans la définition des espèces procaryotes. D'une part, leur reproduction clonale empêche de leur appliquer le critère d'interfécondité. D'autre part, la forte incidence de la recombinaison, et plus encore, des transferts latéraux de matériel génétique compliquent l'établissement de clusters phénotypiques et génétiques cohérents chez les bactéries (Doolittle & Papke, 2006; Hanage *et al.*, 2005).

La classification des bactéries et la façon de définir une espèce bactérienne ont été plusieurs fois transformées par l'apparition de nouvelles techniques. Plusieurs critères permettant de définir des espèces bactériennes ont donc été proposées, avant et après l'avènement de la génomique et des séquençages massifs (Doolittle & Zhaxybayeva, 2009; Achtman & Wagner, 2008; Gevers *et al.*, 2005; Schleifer, 2009).

A. Taxinomie et phylogénie phénotypiques

1. Définition des espèces bactériennes sur la base du phénotype

Les premières tentatives de classification des bactéries remontent au milieu du 19^{ième} siècle. L'observation au microscope des procaryotes, qui sont à l'époque rattachés au royaume végétal, entraîne leur classification sur la base de leur morphologie comme c'est le cas pour les plantes. En effet, ce n'est qu'en 1962 qu'une différenciation entre procaryotes et eucaryotes est proposée sur la base de leur ultrastructure (Stanier & Niel, 1962). Cependant, la faible diversité des morphologies bactériennes conduit rapidement à prendre en compte d'autres paramètres phénotypiques comme les exigences de croissance ou la réaction aux colorations (Winslow *et al.*, 1917; Schleifer, 2009). Le but de la classification est alors davantage de décrire et d'identifier d'éventuels pathogènes que d'établir des relations évolutives entre les espèces.

2. La taxinomie numérique : première tentative de phylogénie

La prise en compte de paramètres phénotypiques de plus en plus nombreux conduit à une première tentative de phylogénie des espèces bactériennes grâce à la taxinomie numérique. Cette technique se fonde sur la somme des caractères, tels que la morphologie des colonies et des bactéries observées au microscope, la réaction aux colorations, et plusieurs réactions biochimiques, pour mettre en relation les espèces ayant des points communs (Sneath & Cowan, 1958; Focht & Lockhart, 1965; Sneath & Sokal, 1973). Si la taxinomie numérique permet d'obtenir des classifications précises grâce au grand nombre de caractères pris en compte, l'un des problèmes principaux est son manque de reproductibilité, les phénotypes variant avec les conditions de culture ou le stockage prolongé (Lockhart, 1967). Plus important, la taxinomie numérique est une approche phénétique et non évolutive : les espèces sont reliées sur la base d'une ressemblance morphologique et biochimique, mais les souches ainsi rapprochées n'ont pas forcément d'ancêtre commun (Schleifer, 2009).

B. Taxinomie et phylogénie moléculaires

1. Utilisation des gènes de l'ARN 16S

L'ARN ribosomique 16S est proposé en 1977 comme un marqueur moléculaire complémentaire des autres méthodes taxinomiques (Fox *et al.*, 1977). Avec l'apparition du séquençage, on passe rapidement d'une méthode de *fingerprinting*, qui implique la digestion directe de l'ARN ribosomique, au séquençage des gènes codant cet ARN (Stackebrandt *et al.*, 1992; Stackebrandt *et al.*, 2002).

Les gènes de l'ARN 16S se révèlent des outils extrêmement puissants en phylogénie : ils sont ubiquitaires parmi les bactéries, contiennent à la fois des régions conservées et variables, et sont considérés comme peu sujets au transfert horizontal à cause de leur importance fonctionnelle

(Schleifer, 2009; Rajendhran & Gunasekaran, 2011). La fréquence et la nature des mutations affectant chaque position nucléotidique des séquences 16S peuvent être prédites, permettant l'établissement de modèles d'évolution moléculaire des séquences 16S. Au contraire des phénotypes non-moléculaires, les séquences 16S permettent ainsi d'établir des relations évolutives entre les espèces bactériennes, et servent d'horloge moléculaire permettant de dater les séparations entre les différents taxons bactériens (Woese, 1987).

Cependant, si le séquençage des gènes de l'ARN 16S est très utile pour établir un continuum évolutif entre les bactéries, son utilisation en taxinomie pour délimiter les espèces est plus compliquée. Il est généralement considéré que deux bactéries ayant moins de 98,7% d'identité entre leurs séquences 16S appartiennent à des espèces différentes, mais l'inverse n'est pas vrai : des bactéries considérées comme d'espèces différentes peuvent partager plus de 98,7% de leurs séquences 16S (Schleifer, 2009). De plus, ce seuil a été déterminé grâce à des études corrélant l'identité du 16S à l'analyse phénétique des caractères biochimiques et morphologiques des espèces, qui restent arbitraires (Rajendhran & Gunasekaran, 2011). Une autre difficulté dans l'analyse des séquences 16S est que les bactéries possèdent plusieurs opérons ribosomiaux, qui divergent parfois fortement dans leurs séquences (Schleifer, 2009). Pour contourner ce problème, d'autres gènes conservés ont été introduits dans les analyses phylogénétiques.

2. Utilisation de plusieurs gènes conservés

L'analyse de plusieurs gènes conservés au lieu d'un locus unique permet de diluer les variations causées par la divergence d'un gène. Une approche devenue très courante est donc de concaténer les séquences de plusieurs gènes de ménage (par exemple les gènes de la protéine chaperone *groEL*, de l'ARN polymérase *rpoB*, de l'ADN gyrase *gyrB* et de la protéine de choc thermique *dnaK*) en complément des gènes 16S pour réaliser les analyses taxinomiques et phylogénétiques (Schleifer, 2009; Gevers *et al.*, 2006). Des gènes moins conservés que les gènes de ménage, mais ayant des homologues dans toutes les souches étudiées peuvent également être analysés pour augmenter la résolution de la classification (Schleifer 2009; Rajendhran & Gunasekaran, 2011). Cependant, même si l'analyse de plusieurs loci au lieu d'un seul gène 16S permet d'augmenter la résolution, les mêmes obstacles se posent dans les deux cas : aucun set de gène utilisables en routine pour assigner une bactérie nouvellement découverte à une espèce, ni aucun seuil d'identité définissant une espèce ne sont arrêtés.

Par ailleurs, même si la concaténation d'au moins 12 gènes conservés est recommandée (Schleifer, 2009), ceci ne représente qu'une fraction très limitée du génome. D'autres techniques prenant en compte le génome entier peuvent donc être utilisées en taxinomie bactérienne.

C. Définition génomique de l'espèce bactérienne

1. L'utilisation du génome entier pour définir une espèce bactérienne

a. Hybridation ADN-ADN

Historiquement, la première méthode prenant en compte l'ensemble du génome en taxinomie bactérienne est l'hybridation ADN-ADN. Deux bactéries sont considérées comme appartenant à la même espèce si le taux d'hybridation de leurs ADN respectifs est supérieur à 70%. On utilise aussi le critère du ΔT_m , la différence de température de fusion entre les hybrides ADN-ADN homologues et hétérologues, qui doit être inférieure à 5% pour considérer que les ADN testés appartiennent à la même espèce bactérienne (Vandamme *et al.*, 1996). Encore une fois, ce seuil utilisé pour délimiter une espèce a été choisi pour sa corrélation avec les espèces déjà définies grâce aux analyses phénotypiques et aux séquences 16S (Gevers *et al.*, 2006). Cependant, c'est actuellement la valeur de référence dans la description des espèces bactériennes (Schleifer, 2009; Rajendhran & Gunasekaran, 2011).

b. Average nucleotide identity (ANI)

Lorsque les séquences génomiques complètes sont disponibles, le taux d'identité entre les gènes partagés peut renseigner sur la distance évolutive entre les deux bactéries étudiées. Ainsi, une identité de nucléotides (average nucleotide identity, ANI) de 95% est corrélée avec les 70% d'hybridation ADN-ADN (Konstantinidis & Tiedje, 2005).

c. La définition polyphasique de l'espèce bactérienne

Actuellement, les espèces bactériennes sont majoritairement définies par la combinaison de facteurs phénotypiques, moléculaires et biologiques exposés plus haut. Cette approche est désignée sous le nom de « taxinomie polyphasique ». Ainsi, une espèce bactérienne sera, en pratique, désignée comme un groupe montrant plus de 97% d'identité des séquences 16S et plus de 70% d'hybridation ADN-ADN, ainsi que des caractères phénotypiques partagés (Vandamme *et al.*, 1996). Lors de la description d'une nouvelle bactérie, la séquence de son ADN 16S est souvent utilisée pour déterminer sa position taxinomique, qui est ensuite affinée par les expériences d'hybridation ADN-ADN (Gevers *et al.*, 2005; Gevers *et al.*, 2006).

2. Les concepts apportés par la génomique comparative

a. L'importance de la variabilité génomique et des transferts horizontaux de gènes

Dès les années 1990, des divergences entre les classifications obtenues par l'analyse des séquences de gènes conservés et celles obtenues par l'hybridation ADN-ADN sont observées. Par exemple, au sein du genre *Sporosarcina*, les espèces *S. globispora* et *S. psychrophila* partagent 99,8% d'identité

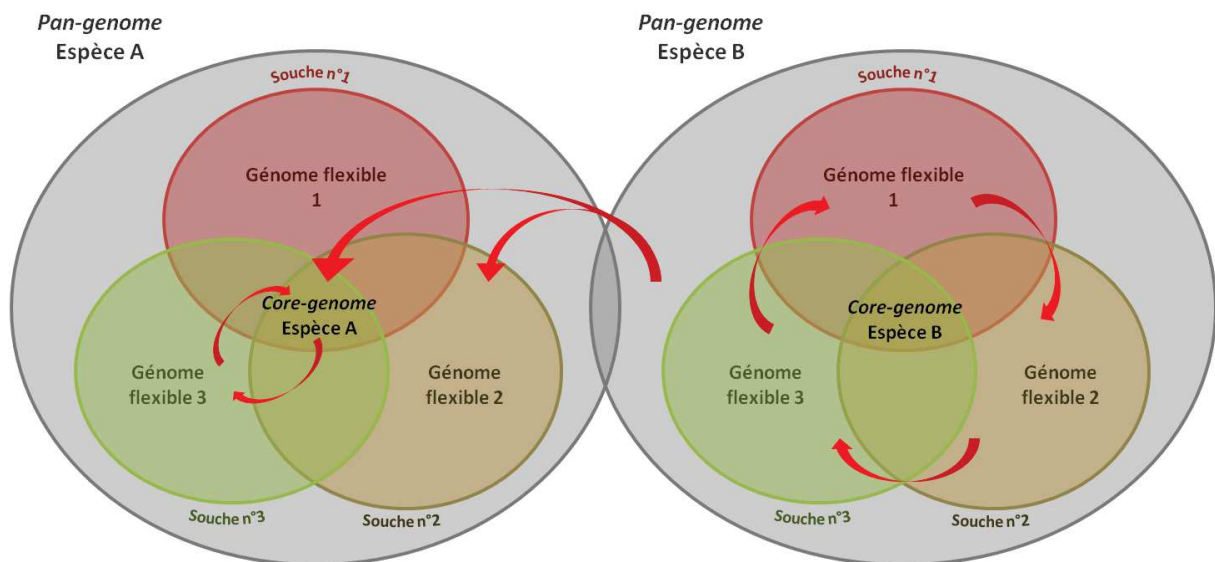


Figure 5. *Core-genome*, génomes flexibles et *pan-genome*. Le *core-genome* est composé des gènes homologues présents dans toutes les souches d'une espèce ; les génomes flexibles sont spécifiques à chaque souche. L'ensemble formé par le *core-génome* et les génomes flexibles est le *pan-genome* ; les transferts horizontaux de gènes, représentés par les flèches rouges, peuvent avoir lieu entre les génomes flexibles ou entre les *core-genomes*, de façon intra- ou inter-spécifique.

des séquences 16S, mais seulement 23 à 50% d'hybridation ADN-ADN (Fox *et al.*, 1992). Le même cas de figure se retrouve chez *Bacillus subtilis* (Nakamura *et al.*, 1999; Earl *et al.*, 2007).

Avec l'augmentation du nombre de génomes séquencés, les approches de comparaison génomique ont mis en évidence l'énorme plasticité des génomes bactériens (Binnewies *et al.*, 2006). Au sein de groupes bactériens considérés comme des espèces sur la base des approches polyphasiques, la taille et le contenu des génomes peut varier énormément (Boucher *et al.*, 2001). Par exemple, la taille du génomes de *E. coli* varie entre 5,2 et 4,6 Mb selon les souches, qui ne partagent que 30% de leur contenu génétique (Welch *et al.*, 2002; Touchon *et al.*, 2009). De nombreuses souches identiques dans leurs séquences 16S, mais aux génomes extrêmement variables coexistent, dans l'environnement (Peña *et al.*, 2010; Thompson *et al.*, 2005; Kashtan *et al.*, 2014), ou en association avec un hôte (Israel *et al.*, 2001; Engel *et al.*, 2014).

A côté des divergences entre les différents moyens de classification, la prise de conscience de l'importance des transferts horizontaux dans l'évolution bactérienne complique les classifications. Chez *E. coli*, environ 20% des gènes sont issus d'un transfert horizontal, et 75% des familles protéiques ont été concernées par le transfert horizontal (acquisition par transfert ou mobilisation) (Popa & Dagan, 2011). D'une part, l'acquisition d'un îlot génomique peut changer radicalement les phénotypes bactériens (Groisman & Ochman, 1996). D'autre part, le transfert horizontal concerne des gènes utilisés en phylogénie (Yerrapragada *et al.*, 2009), dont les gènes de l'ARN 16S (Harth *et al.*, 2007; Kitahara & Miyazaki, 2013), ce qui peut entraîner des incongruences dans les arbres phylogénétiques obtenus.

b. Core-genome, génome flexible et pan-genome

En réaction à l'extrême variabilité de contenu entre les génomes, les concepts de « *core-genome* » et de « génome flexible » ont été proposés (Figure 5; Lan & Reeves, 2000; Mira *et al.*, 2010) :

- Le *core-genome* représente l'ensemble des gènes partagés par toutes les souches comparées. Il comprend les gènes de ménage et les gènes responsables des phénotypes majeurs d'une espèce bactérienne (Lan & Reeves, 2000; Ochman *et al.*, 2005).
- Le génome flexible (ou génome accessoire) est spécifique aux souches bactériennes. Il comprend des gènes non essentiels qui permettent l'adaptation à un environnement donné. Le génome flexible est organisé en RGP (Mathee *et al.*, 2008).

La somme du *core-genome* et des génomes flexibles de toutes les souches comparées forme le *pan-genome* d'une espèce (Figure 5; Mira *et al.*, 2010; Medini *et al.*, 2005; Tettelin *et al.*, 2005).

Le *pan-genome* forme le répertoire génomique d'une espèce et excède largement la taille d'un génome seul, car il prend en compte la variabilité des génomes flexibles. Le *pan-genome* peut être ouvert ou fermé :

- Dans le cas d'un *pan-genome* ouvert, chaque souche séquencée ajoute de nouveaux gènes au *pan-genome*. C'est le cas de bactéries régulièrement soumises aux transferts horizontaux de gènes (Figure 5), comme *E. coli* (Konstantinidis & Tiedje, 2005) ou *Streptococcus agalactiae* (Tettelin *et al.*, 2005). Ainsi, une bactérie ubiquiste telle que *Pseudomonas aeruginosa* a un répertoire génomique dont la taille dépasse celle du génome humain (Tümmler *et al.*, 2014).
- A l'opposé, la taille d'un *pan-genome* fermé n'augmente que très peu avec l'ajout de nouvelles souches, c'est-à-dire que la quasi-totalité du répertoire génomique a été décrite. C'est le cas pour les espèces non soumises aux transferts horizontaux, comme *B. aphidicola*, ou d'une « fausse espèce » comme *B. anthracis*, qui appartient génétiquement à *B. cereus* (Medini *et al.*, 2005; Mira *et al.*, 2010).

c. Les arbres phylogénétiques fondés sur les *core-genomes*

Plusieurs classifications phylogénétiques prenant en compte l'ensemble des procaryotes ont été réalisées sur la base des *core-genomes* (Daubin *et al.*, 2003; Philippe & Douady, 2003). Dans ces analyses, les transferts horizontaux de gènes sont considérés comme rares, ou n'ayant pas une influence déterminante sur l'arbre obtenu (Ochman *et al.*, 2005; Galtier & Daubin, 2008; Abby *et al.*, 2012).

Cependant, les critiques soulevées par les analyses de gènes conservés peuvent également être faites dans le cas d'une classification utilisant le *core-genome*. D'une part, les transferts horizontaux concernent également les gènes appartenant au *core-genome* (Boucher *et al.*, 2001; Nicolas *et al.*, 2007). D'autre part, l'une des critiques majeures est la faible proportion du génome prise en compte. En effet, la taille du *core-genome* diminue mécaniquement lorsque de nouveaux génomes sont ajoutés à l'analyse, ce qui fait que les arbres phylogéniques universels réalisés sur cette base prennent en compte moins de 1% du génome (Dagan & Martin, 2006).

d. Vers l'abandon de la notion d'espèce bactérienne ?

Actuellement, il n'existe aucune définition pleinement satisfaisante de l'espèce bactérienne (Doolittle & Papke, 2006; Achtman & Wagner, 2008; Gevers *et al.*, 2005). Ainsi, on voit émerger dans la littérature scientifique deux visions : une vision « optimiste » et une vision « pessimiste » de l'espèce bactérienne (Schleifer, 2009; Klenk & Göker, 2010; Philippe & Douady, 2003).

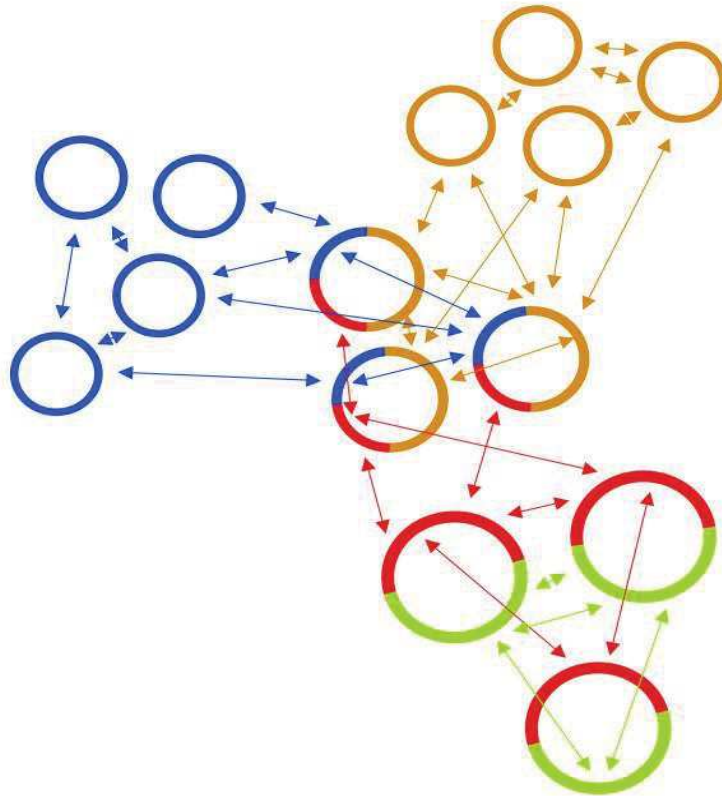


Figure 6. Transferts horizontaux, clusters de populations et espèce bactérienne (Doolittle & Papke, 2006). Les cercles représentent les génomes de bactéries se regroupant en clusters de populations. Les cercles bleus, jaunes et vert/rouge forment 3 clusters indépendants. Il n’y a pas de transfert horizontal entre ces trois clusters horizontaux (représentés par les flèches), qu’on peut donc désigner comme trois espèces différentes. Au centre, une population mosaïque, appartenant aux trois espèces à la fois, a été créée par divers transferts horizontaux. Cette population est une «plaque tournante» dans le réseau de transfert horizontal formé par les génomes.

i. La vision « optimiste » : l'espèce bactérienne comme clusters de populations

Un résumé de la vision « optimiste » est qu'il existe des clusters bactériens séparés les uns des autres, correspondant à la notion d'espèce (Figure 6, clusters en jaune, bleu et rouge/vert), et qu'il ne reste qu'à trouver les critères permettant de les différencier (Tang & Liu, 2012). Le pourcentage de gènes ayant des séquences identiques chez deux souches (Tang *et al.*, 2013) et le degré de divergence entre deux souches (Vos, 2011) ont récemment été proposés comme critères. Cette vision de l'espèce bactérienne est soutenue par l'observation que de nombreux transferts horizontaux de gènes ont lieu entre bactéries phylogénétiquement proches (Popa *et al.*, 2011; Ochman *et al.*, 2005). Il existe en effet plusieurs barrières aux transferts horizontaux de gènes qui dépendent de la proximité phylogénétique entre donneuse et receveuse :

- Dans la bactérie receveuse, les systèmes de restriction/modification (Kobayashi, 2001) ainsi que les CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeat*, (Marraffini & Sontheimer, 2008) dégradent les ADN étrangers. Le succès du transfert horizontal repose donc sur la similarité de ces deux systèmes entre les bactéries donneuse et receveuse (Thomas & Nielsen, 2005).
- L'intégration d'un fragment d'ADN étranger dans l'ADN résident de la bactérie se fait couramment par recombinaison homologue, ce qui suppose une similarité de séquence entre ces deux ADN (Popa & Dagan, 2011; Thomas & Nielsen, 2005).

Ces barrières aux transferts génétiques horizontaux seraient donc l'équivalent procaryote du critère de reproduction sexuée utilisé dans la définition des espèces eucaryotes (Ochman *et al.*, 2005). Selon la théorie des écotypes (Cohan & Koeppel, 2008; Cohan, 2002), les espèces bactériennes pourraient ainsi être définies, à la manière des espèces eucaryotes, comme des clusters de populations échangeant des gènes entre elles et isolées « reproductivement » des autres clusters (Fraser *et al.*, 2009; Sheppard *et al.*, 2008). Cette théorie est confirmée par l'étude des métagénomés de plusieurs communautés microbiennes, qui semblent effectivement organisées en clusters (Caro-Quintero & Konstantinidis, 2012).

ii. La vision « pessimiste » : un continuum de souches bactériennes

La difficulté à séparer des clusters bactériens les uns des autres a mené à remettre en cause leur existence dans une vision « pessimiste » de l'espèce bactérienne. Dans cette vision, si des clusters bactériens existent, l'importance des transferts horizontaux empêchent de les séparer et de retrouver leur ancêtre commun (Figure 6, population centrale en rouge, bleu et jaune). C'est ainsi que plusieurs auteurs ont proposé une manière de visualiser l'évolution bactérienne sous forme de réseaux de gènes transférés plutôt que sous forme d'arbres (Dagan, 2011; Kunin *et al.*, 2005). Dans cette vision pessimiste, les frontières entre les espèces bactériennes sont floues (Hanage *et al.*, 2005;

Lawrence, 2002), voire inexistantes (Konstantinidis *et al.*, 2006), car de nombreux échanges de gènes ont lieu entre les génomes accessoires des différentes souches (Boucher *et al.*, 2001). Le fait est que la majorité (74%) des transferts horizontaux de gènes ont lieu au sein d'un habitat commun (Popa & Dagan, 2011), ce qui a amené à proposer le concept de *pool* de gènes habitat-spécifique (Polz *et al.*, 2013; Norman *et al.*, 2009). Au sein d'une niche écologique donnée, les diverses bactéries seraient donc reliées par des transferts horizontaux continus de gènes, et certaines bactéries formeraient des « plaques tournantes » (Kunin *et al.*, 2005).

iii. La taxinomie sans l'espèce

En réalité, les deux visions coexistent : certaines souches bactériennes se groupent en clusters très homogènes, correspondant à la définition canonique de l'espèce, tandis que chez d'autres les limites sont très floues (Segerman, 2012).

Il est vrai que les génomes dont nous disposons actuellement ne représentent que peu la diversité bactérienne totale : notre définition de l'espèce bactérienne pourrait bénéficier de génomes plus variés (Klenk & Göker, 2010), ce qui pourrait mener à confirmer (ou à infirmer) l'existence d'espèces bactériennes, et à définir un éventuel *cut-off* pour les séparer les unes des autres. En particulier, éclaircir l'effet de la barrière formée par la recombinaison pourrait aider à choisir entre les hypothèses « optimiste » et « pessimiste ».

La notion de *pool* de gènes partagés n'est pas irréconciliable avec l'existence de clusters bactériens : des populations clonales spécialisées peuvent très bien émerger au sein des réseaux bactériens. Ainsi, la notion d'espèce bactérienne peut être dissociée de la notion de spéciation (Lawrence, 2002). En pratique, pour étudier une espèce bactérienne sans définition précise de ce qu'est l'« espèce bactérienne », la tendance est de rapprocher des souches sur la base des gènes conservés (Doolittle & Zhaxybayeva, 2009; Doolittle & Papke, 2006; Hanage *et al.*, 2006). La création d'un statut taxinomique pour les clones a également été proposée (Lan & Reeves, 2001). En effet, la taille du *pan-genome* est théoriquement infinie chez les bactéries restant soumises aux transferts horizontaux; les séquences génomiques dont nous disposons sont celles d'isolats et ne représentent donc qu'une partie de la diversité d'une espèce bactérienne.

Conclusion

Depuis le 19^{ième} siècle, plusieurs techniques ont été utilisées pour tenter de définir les contours des espèces bactériennes et d'établir les relations phylogénétiques entre elles. Cependant, les comparaisons génomiques ont mis en évidence l'importance du transfert horizontal entre bactéries d'un même environnement et la variabilité des génomes entre des souches bactériennes appartenant à une même espèce, jusqu'à remettre en cause la notion même d'espèce bactérienne. Leur existence reste donc actuellement débattue.

III- Evolution des génomes bactériens

Les théories darwiniennes et néo-darwiniennes expliquent l'origine des espèces par la variation génétique suivie de la sélection par la niche écologique (Darwin, 1859; Kutschera & Niklas, 2004). Ainsi, au sein des populations bactériennes, les individus subissent continuellement des variations génomiques comme des réarrangements, des acquisitions ou des délétions génomiques, leur permettant l'adaptation à cette niche. La comparaison génomique entre des souches phylogénétiquement proches, mais occupant des niches écologiques différentes, a permis de comprendre les interactions entre la plasticité du génome et l'adaptation à l'environnement.

A. Variations cryptiques au sein du génome

Des réarrangements génomiques n'entraînant aucun changement visible en conditions de laboratoire semblent avoir continuellement lieu chez les bactéries. De nombreuses inversions et translocations ont par exemple été détectées entre différents isolats de *Yersinia pestis* (Parkhill *et al.*, 2001), d'*Ochobactrum intermedium* (Teyssier *et al.*, 2003), de *Salmonella* (Liu *et al.*, 2003; Helm *et al.*, 2003) ou de *Rhizobium* sp. (Mavingui *et al.*, 2002), sans conséquence phénotypique visible. De la même façon, chez la bactérie pathogène d'insecte *Phototrhhabdus luminescens*, il existe un variant génomiques caractérisé par une large duplication, sans conséquence sur le phénotype (Gaudriault *et al.*, 2008).

Les réarrangements génomiques spontanés sont à l'origine de sous-populations bactériennes possédant des génotypes différents coexistant au sein d'une même culture (Guo *et al.*, 2003; Stover *et al.*, 2000; Parkhill *et al.*, 2001; Gaudriault *et al.*, 2008), ce qui permet probablement l'adaptation rapide à une niche écologique spécifique. Ainsi, chez les bactéries pathogènes du genre *Salmonella*, les sérotypes spécifiques à un hôte montrent de fréquentes translocations qui n'existent pas chez les souches plus généralistes (Helm *et al.*, 2003).

La perturbation de l'axe *ori-dif* a de fortes conséquences sur la croissance bactérienne. Ainsi, la souche CDC 684 de *Bacillus anthracis* voit son temps de génération et sa virulence fortement diminués par un tel déséquilibre (Okinaka *et al.*, 2011). De nombreuses translocations autour de l'axe *ori-dif*, comme chez *Streptococcus* (Maruyama *et al.*, 2009; Nakagawa *et al.*, 2003), *Yersinia* (Darling *et al.*, 2008) ou d'autres genres bactériens (Tillier & Collins, 2000; Suyama & Bork, 2001) s'expliquent donc par la nécessité d'égaliser la taille des réplichores à la suite d'une délétion ou d'une insertion sont également fréquentes.

B. Acquisition de nouvelles fonctions

Deux mécanismes permettent l'acquisition de nouveaux gènes : la duplication d'un gène, qui peut être suivie par la divergence de l'une des copies, et le transfert horizontal de gènes. Dans un génome, deux gènes homologues (ayant un ancêtre commun) sont dits « paralogues » s'ils sont issus d'une duplication, et « xénologues » si l'un des deux est issu d'un transfert horizontal (Gevers *et al.*, 2004).

1. Acquisition de fonctions par duplication

Les duplications de gènes sont fréquentes dans les génomes bactériens, mais les copies en surnombre sont en général rapidement perdues, sauf si leur présence apporte un avantage évolutif. C'est le cas si l'un des gènes paralogues diverge, apportant une nouvelle fonction à la bactérie. En effet, la fonction de base étant assurée par l'une de deux copies, la pression de sélection est relevée sur la seconde copie, qui peut muter (Gevers *et al.*, 2004; Hooper & Berg, 2003). Ce phénomène crée des familles de gènes aux fonctions proches. Par exemple, la famille des transporteurs ABC (*ATP-binding cassette*) comprend des paralogues possédant des spécificités pour différents substrats (Zheng *et al.*, 2013). Dans le cas des enzymes SDR (*short-chain deshydrogenases*), on retrouve des paralogues communs à plusieurs espèces bactériennes et impliqués dans le métabolisme de base, et des paralogues présents uniquement chez les entérobactéries, qui leur ont permis de s'adapter à l'intestin grâce à des fonctions plus spécifiques comme la synthèse d'exopolysaccharides ou la dégradation de la bile (Serres *et al.*, 2009). Certains paralogues, dits « écoparalogues », sont spécifiquement adaptés à des conditions environnementales données, comme une forte salinité (Sanchez-Perez *et al.*, 2008; Bratlie *et al.*, 2010).

2. Acquisition de fonctions par transfert horizontal

La duplication suivie de la spécialisation d'un gène est un processus évolutif graduel. Au contraire, l'intégration d'un MGE, organisé en clusters autonomes, permet à une bactérie d'acquérir en une seule fois des fonctions directement utilisables. Par exemple, des facteurs de virulence « offensifs », qui suffisent à augmenter fortement la pathogénicité des bactéries (adhésines, toxines, systèmes de sécrétion de type III) sont plus souvent contenus dans les MGE que dans le reste du génome (Ho Sui *et al.*, 2009). Chez les souches entéropathogènes d'*E. coli*, un seul PAI, appelé LEE (*locus of enterocyte attachment*) et codant une adhésine, un système de sécrétion de type III ainsi que ses effecteurs, permet l'attachement et la destruction de la barrière intestinale (Gal-Mor & Finlay, 2006). Chez les souches uropathogènes, des adhésines et des hémolysines sont également codées par les PAI (Hacker *et al.*, 2004). Les MGE permettent donc une « évolution en bonds quantiques » (Groisman & Ochman, 1996). Les transferts horizontaux entre bactéries sont ainsi la principale force évolutive chez les bactéries, devant la création de nouveaux gènes par duplication suivie de divergence (Ochman *et al.*, 2000; Lerat *et al.*, 2005).

De nombreuses bactéries ont pu coloniser de nouveaux environnements grâce au gain d'îlots génomiques. Elles peuvent par exemple devenir pathogènes (Raskin *et al.*, 2006). Ainsi, les bactéries du genre *Shigella* ont un contenu génomique très proche de celui des *E. coli* commensales de l'intestin. L'acquisition d'un plasmide de virulence codant des gènes nécessaires à l'établissement d'un mode de vie intracellulaire, et de plusieurs PAI codant des toxines, des protéases, et des facteurs permettant l'acquisition du fer et la modification du lipopolysaccharide (LPS), a donné naissance aux *Shigella* pathogènes, qui formeraient en réalité une espèce au sein du genre *Escherichia* (Jin *et al.*, 2002; Prosseda *et al.*, 2012; Touchon *et al.*, 2009).

Chez la bactérie *Staphylococcus aureus*, un pathogène opportuniste responsable d'infections nosocomiales, la virulence est liée à la présence de nombreux MGE. On y retrouve plusieurs PAI contenant des gènes de toxines (comme *seb* et *sec*, qui codent les enterotoxines B et C), d'antigènes (dont le superantigène Tst, responsable du syndrome de choc toxique) et de nombreux gènes de résistance aux antibiotiques. La résistance aux antibiotiques est également assurée par des gènes appartenant à des plasmides non conjugatifs et des transposons. Enfin, les prophages, en plus de coder des toxines de virulence majeures (comme l'entérotoxine A ou la toxine exfoliative A, (Lindsay & Holden, 2004; Gill *et al.*, 2005), jouent un rôle important dans la mobilisation et la dissémination des facteurs de virulence (Gill *et al.*, 2005; Ubeda *et al.*, 2005). Au sein du genre *Staphylococcus*, on trouve également *S. epidermidis*, un pathogène moins virulent. Cependant, au sein de cette espèce, on trouve certaines souches ayant acquis par transfert horizontal des toxines qui augmentent leur virulence, ce qui révèle une évolution vers un pathogène plus agressif en cours (Gill *et al.*, 2005).

L'acquisition de gènes permet également l'adaptation de souches bactériennes à des niches environnementales spécifiques. Par exemple, les actinomycètes du genre *Rhodococcus* sont ubiquitaires dans l'environnement. Une seule espèce, *R. equi*, est un pathogène intracellulaire opportuniste, qui se retrouve aussi dans le fumier et l'intestin des équins, bovins et porcins. Cette espèce a acquis lors d'un évènement de transfert horizontal un plasmide de virulence et deux PAI, codant un antigène de surface (VapA) et des adhésines nécessaires à l'invasion et à la survie intracellulaire au sein des macrophages de l'hôte. En revanche, les espèces environnementales, telles que *R. jostii*, contiennent des gènes de voies métaboliques acquis principalement lors d'évènements de duplication-divergence, mais également par HGT, qui leur permettent d'utiliser une grande variété de sucres, d'être prototrophes pour les vitamines ou de dégrader des composés aromatiques (Letek *et al.*, 2010; McLeod *et al.*, 2006). Différentes populations bactériennes ont donc probablement chacune acquis par transfert horizontal des gènes venus de bactéries fréquentant la même niche écologique qu'elles, leur permettant de s'adapter à cette niche et entraînant une divergence des espèces au sein du genre *Rhodococcus*.

Encadré : les associations bactérie-hôte

1. Association du point de vue de l'hôte

a. Effet de l'association sur l'hôte

Les bactéries associées à un hôte peuvent avoir un effet positif, négatif ou neutre sur celui-ci. Le terme « symbionte », au sens large, a été proposé pour désigner toute bactérie associée à un hôte, d'autant plus que, le but étant dans les deux cas d'infecter un hôte, les mécanismes d'établissement d'une symbiose et de pathogénicité sont similaires (Hentschel *et al.*, 2000). Cependant, le terme de « symbionte » est couramment employé pour désigner une interaction mutualiste, c'est-à-dire bénéfique pour les deux partenaires (Dale & Moran, 2006; Hentschel *et al.*, 2000; Ochman & Moran, 2001). A l'opposé, une bactérie pathogène a un effet négatif sur l'hôte, et une bactérie commensale, un effet neutre. Chez les insectes, les manipulateurs reproductifs tels que *Wolbachia* sp. sont un cas particulier de symbiontes, transmis par la mère et qui se propagent en introduisant un biais reproductif envers les femelles (Dale & Moran 2006; Moran *et al.*, 2008; Sicard *et al.*, 2014).

b. Nécessité de l'association pour l'hôte

Les interactions mutualistes avec une bactérie symbiotique peuvent se révéler nécessaires, ou non, pour la survie et la reproduction de l'hôte :

- Les symbiontes facultatifs ne sont pas requis pour la vie normale de l'hôte, mais augmentent la fitness des hôtes porteurs. Par exemple, l'association entre le poulpe *Euprymna scolopes* et la bactérie *Vibrio fischeri* permet au poulpe d'émettre de la lumière et d'éviter les prédateurs, mais n'est pas nécessaire à sa survie (Claes & Dunlap, 2000). Chez les insectes, *Hamiltonella defensa* augmente la survie de la mouche *Bemisia tabaci* lors de stress nutritionnels (Su *et al.*, 2014) et *Regiella insecticola* protège le puceron *Acyrtosiphon pisum* contre les infections fongiques (Scarborough *et al.*, 2005). Les symbiontes facultatifs peuvent être transmis maternellement ou envahir un hôte naïf.
- Les symbiontes obligatoires sont eux requis pour le développement normal de l'hôte. Ils sont transmis maternellement et incapables d'envahir un hôte naïf : ils dépendent entièrement de mécanismes mis en place par l'hôte pour se transmettre et coévoluent avec lui. Cette catégorie comprend notamment *Buchnera aphidicola*, qui fournit des acides aminés à plusieurs espèces de pucerons, ou les bactéries pathogènes d'insectes *Photorhabdus* et *Xenorhabdus* qui tuent et digèrent des insectes pour fournir des nutriments à leur hôte nématode (Goodrich-Blair & Clarke, 2007).

2. Association du point de vue de la bactérie

Du point de vue de la bactérie symbiotique (au sens large), l'association avec un hôte peut être obligatoire ou facultative :

- Les symbiontes facultatifs (*Brucella* sp., *R. equi*, *Salmonella* sp., *Mycoplasma tuberculosis*, *Rhizobium*...) sont également capables de survivre hors de leur hôte.
- Les symbiontes obligatoires (*Rickettsia* sp., *Coxiella burnetii*, *Mycoplasma leprae*, *Wolbachia* sp., *B. aphidicola*) ne sont capables de survivre que dans le cytoplasme des cellules de l'hôte.

De la même façon, *Streptococcus thermophilus*, une bactérie lactique utilisée dans la fabrication du yogourt, s'est adaptée à une niche écologique différente des autres espèces de *Streptococcus*, qui sont pathogènes. *S. thermophilus* contient ainsi un îlot génomique ayant permis son adaptation au lait, composé de gènes issus d'autres bactéries lactiques (Bolotin *et al.*, 2004).

C. Perte de fonctions et réduction génomique

L'acquisition de fonctions permet aux bactéries de coloniser de nouvelles niches écologiques. Lors du changement d'environnement, la pression de sélection est accentuée ou relâchée, sur certaines fonctions ou sur la totalité du génome. Selon le cas, ce changement entraîne alors la perte de certaines fonctions ou un phénomène de réduction de la taille du génome.

1. Perte de fonctions lors l'adaptation à un milieu

a. Relâchement de la pression de sélection sur certains gènes

Lors de l'arrivée d'une bactérie dans un milieu riche et stable, le relâchement de la pression de sélection va rapidement entraîner la pseudogénisation de nombreux gènes de métabolisme et de régulation devenus inutiles (Ochman & Davalos, 2006; Karamichali *et al.*, 2014; McCutcheon & Moran, 2012; Mira *et al.*, 2001). C'est par exemple le cas chez les bactéries du genre *Brucella*, qui se sont spécialisées après l'acquisition de MGE leur permettant de coloniser le milieu intracellulaire, et ont perdu les gènes de métabolisme des sucres et des acides aminés qui leur étaient inutiles dans ce nouvel environnement riche (Wattam *et al.*, 2014). *S. thermophilus*, qui a acquis un îlot métabolique permettant sa croissance dans le lait, compte également de nombreux pseudogènes, particulièrement chez les transporteurs de sucres qui lui sont probablement devenus inutiles dans son nouvel environnement (Bolotin *et al.*, 2004). Ainsi, le grand nombre de pseudogènes détectés chez des pathogènes intracellulaires facultatifs (voir encadré) comme *Shigella* sp., *Brucella ovis* et *Treponema paraluis-cuniculi*, ou obligatoires comme *Rickettsia* (Andersson & Andersson, 2001) et *Mycobacterium leprae* (Cole *et al.*, 2001), s'expliquent par une restriction d'hôte récente (Tsolis *et al.*, 2009; Šmajs *et al.*, 2011; Hershberg *et al.*, 2007). De la même façon, 43% du génome se compose de pseudogènes chez la bactérie symbiotique du charançon *Sitophilus oryzae* (SOPE, *S. oryzae* primary endosymbiont) (Oakeson *et al.*, 2014).

b. Perte de gènes due à une pression de sélection purifiante

La sélection purifiante (ou négative) entraîne la perte des gènes ayant un effet délétère. Chez plusieurs bactéries pathogènes, une sélection négative peut s'exercer sur des gènes interférant avec la virulence, entraînant leur perte de fonction. Ainsi, chez *Y. pestis*, le répresseur de la formation de biofilm *rcaA* a subi cette sélection négative : sa pseudogénisation donne en effet un avantage dans la colonisation de l'insecte (Sun *et al.*, 2008).

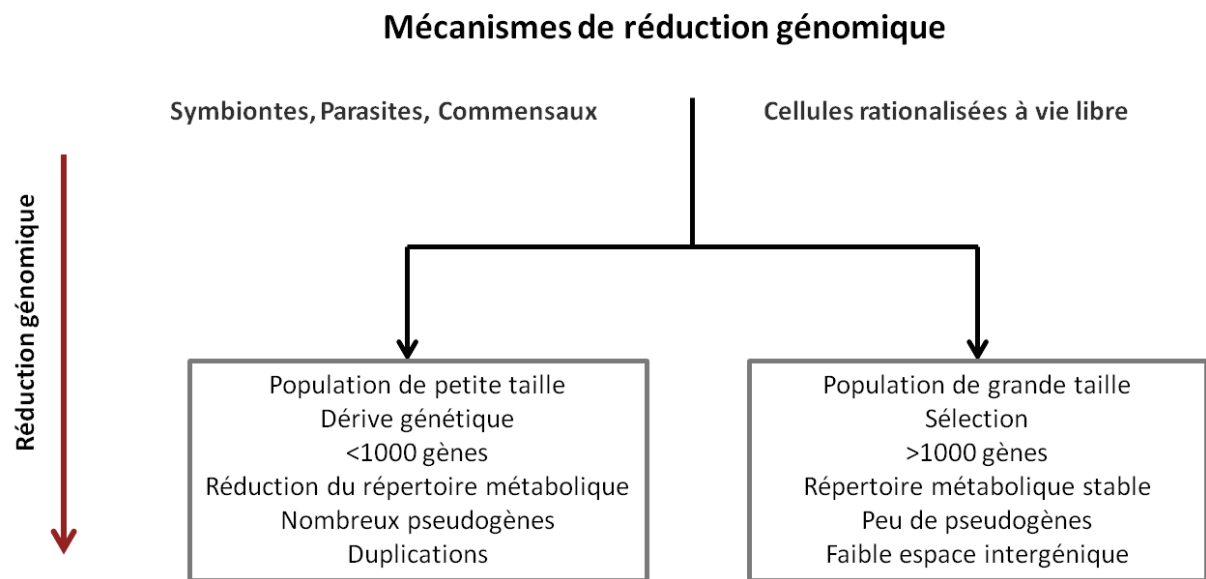


Figure 7. Les mécanismes de la réduction génomique (Giovannoni *et al.*, 2014).

Chez *Shigella*, le gène *cadB* impliqué dans la synthèse de la cadavérine, et qui interfère avec la colonisation du milieu intracellulaire, est pseudogénisé de diverses manières selon les souches, indiquant une forte pression de sélection négative sur ce gène (Prosseda *et al.*, 2012). Une pression de sélection négative peut également s'appliquer sur les pseudogènes toujours exprimés : chez *Salmonella*, les pseudogènes récents, ne comprenant qu'une seule mutation, subissent une forte pression de sélection négative qui entraîne leur délétion avant qu'ils n'accumulent des mutations supplémentaires (Kuo & Ochman, 2009). Ceci peut être dû à un effet toxique du produit de ces pseudogènes, ou au coût métabolique de leur expression.

2. Phénomène de réduction génomique

Les variations de pression de sélection peuvent aussi s'exercer sur l'ensemble du génome, entraînant au fil du temps une réduction de sa taille. Il existe deux mécanismes de réduction génomique : la rationalisation et la dérive génétique (Figure 7).

a. Réduction génomique par rationalisation

Lorsqu'une population bactérienne de grande taille vit au sein d'une niche écologique pauvre en nutriments, une forte sélection purifiante se met en place et élimine les génomes de grande taille, moins efficaces métaboliquement. C'est le processus de rationalisation (*streamlining*) du génome (Figure 7 ; Giovannoni *et al.*, 2014; Giovannoni *et al.*, 2005). Ainsi, les bactéries marines *Prochlorococcus marinus* ou *Pelagibacter ubique* sont parmi les plus répandues dans l'océan ($\sim 10^5$ - 10^6 bactéries/mL, (Dufresne *et al.*, 2005; Giovannoni *et al.*, 2005) et possèdent des génomes rationalisés dont la taille peut descendre jusqu'à 1,3 Mb, la plus petite taille pour une bactérie se répliquant de façon autonome (Giovannoni *et al.*, 2005). Le génome de ces bactéries rationalisées ne contiennent ni pseudogène ni duplication, mais conservent en revanche des gènes impliqués dans le métabolisme de composés simples, permettant la croissance dans un environnement pauvre en nutriments sans utiliser de voie métabolique complexe (Giovannoni *et al.*, 2014; Giovannoni *et al.*, 2005; Dufresne *et al.*, 2005). Chez les bactéries rationalisées du genre *Dehalococcoides*, dont le génome mesure entre 1,3 et 1,5 Mb, deux régions de plasticité génomique sont localisées de part et d'autre de l'origine de réplication (McMurdie *et al.*, 2009), ce qui indique que les transferts horizontaux de gènes restent possibles. De même, aucun gène issu d'un transfert horizontal récent n'a été retrouvé dans le génome de *P. ubique*, mais les gènes permettant la compétence et la transformation ont été conservés (Giovannoni *et al.*, 2005).

b. Réduction génomique par dérive génétique

Lorsqu'une population bactérienne, après avoir acquis des facteurs de virulence ou de symbiose, s'adapte à un hôte (voir encadré), elle subit également une réduction de la taille de son génome (Ochman & Davalos, 2006; Ochman & Moran, 2001). Le processus de réduction diffère alors

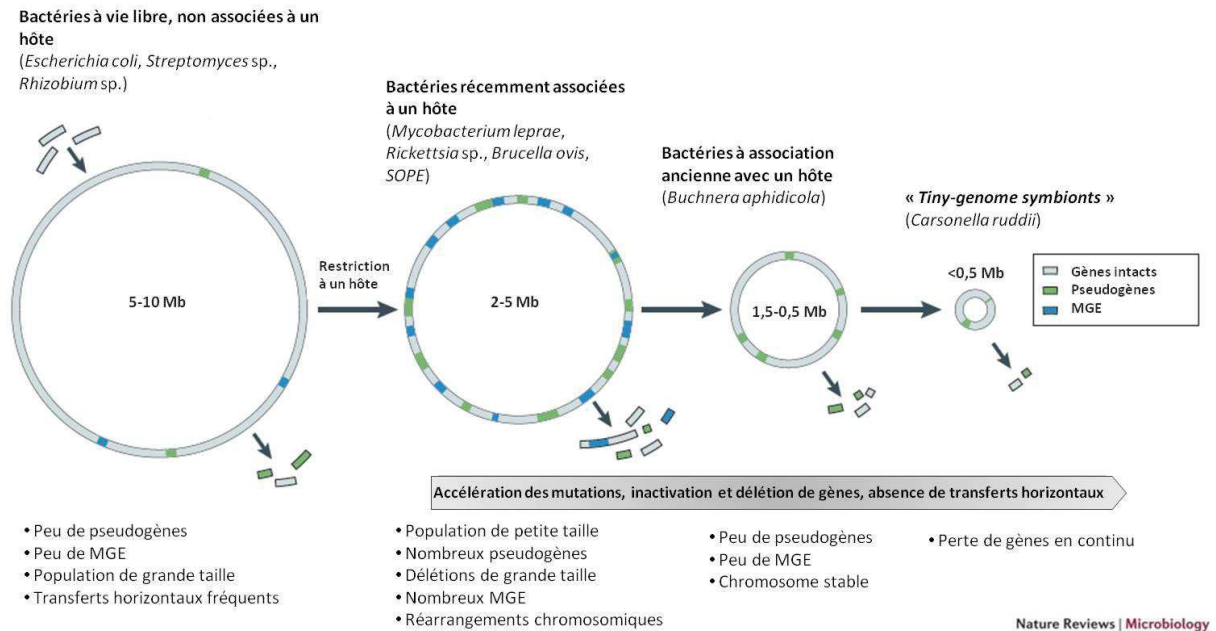


Figure 8. Processus de réduction génomique par dérive génétique (d'après McCutcheon & Moran, 2012 et Ochman & Davalos, 2006).

fondamentalement de la rationalisation (Figure 7) : d'une part, l'hôte est un milieu riche en nutriments, et il existe peu ou pas de pression de sélection métabolique pouvant conduire à une rationalisation du génome ; d'autre part, les populations associées à un hôte sont de petite taille et subissent des phénomènes de goulets d'étranglement réguliers limitant leur diversité génétique et la fréquence des transferts horizontaux (Moran & Plague, 2004). La pression de sélection sur les bactéries associées à un hôte est donc fortement relaxée, ce qui entraîne un phénomène de dérive génétique (Figure 7 ; Giovannoni *et al.*, 2014; Moran & Plague, 2004).

Lorsque la restriction à l'hôte est récente (Figure 8), les génomes contiennent un grand nombre de pseudogènes, de séquences d'insertion et de transposons, car l'inactivation des gènes, même importants, n'est pas contre-sélectionnée efficacement (Moran & Plague, 2004). De nombreuses recombinaisons ont lieu entre les séquences d'insertion, entraînant des réarrangements génomiques comme des translocations chez *Bordetella pertussis* (Parkhill *et al.*, 2003), *Hamiltonella defensa* et *Regiella insecticola* (Degnan *et al.*, 2010), ou des délétions chez *T. paraluiscuniculi* (Šmajs *et al.*, 2011) et SOPE (Oakeson *et al.*, 2014).

Les génomes bactériens subissent un fort biais de délétion. En effet, seule la pression de sélection maintient la présence des gènes au sein du génome: toute séquence n'entraînant pas d'avantage évolutif est donc rapidement perdue (Mira *et al.*, 2001). Lorsque l'association entre la bactérie et son hôte est ancienne, ce biais de délétion entraîne la disparition progressive des séquences d'insertion et des pseudogènes apparus au début de l'interaction (Figure 8). On ne retrouve ainsi plus aucun pseudogène dans le génome du symbionte *Buchnera aphidicola*. Il semble que dans les premiers temps de son adaptation, *B. aphidicola* ait subi de larges délétions à la suite de réarrangements, suivies par une dégradation progressive qui fait que les pseudogènes sont réduits à l'état de traces dans les espaces intergéniques (Moran & Mira, 2001). Les bactéries ayant une association obligatoire ancienne avec leur hôte ont donc une forte densité codante (Moran *et al.*, 2008; Mira *et al.*, 2001) et on y retrouve peu de gènes dupliqués (Hooper & Berg, 2003).

Les bactéries pathogènes conservent les gènes nécessaires à leur transmission d'un hôte à l'autre (Ochman & Moran, 2001). En revanche, chez les bactéries symbiotiques à transmission maternelle, les gènes permettant l'invasion d'un nouvel hôte, ainsi que les gènes essentiels pour la vie libre, comme ceux permettant la synthèse de la paroi cellulaire, peuvent être perdus, et la taille du génome diminue encore (Figure 8). Le phénomène de dérive génétique entraîne donc une réduction génomique plus poussée que la rationalisation (Figure 7), qui conserve ces gènes nécessaires à la vie libre. Ainsi, il a été calculé que *B. aphidicola* avait perdu 77% de son contenu génomique par rapport

à son ancêtre à vie libre, contre seulement 31% chez *Prochlorococcus* (Dufresne *et al.*, 2005; Moran & Mira, 2001).

Chez les symbiotes obligatoires, la stabilité de l'environnement intracellulaire entraîne la disparition des régulateurs et la perte des gènes de réparation et de recombinaison de l'ADN. La dégradation du génome devient alors irréversible, car la bactérie a perdu les mécanismes lui permettant d'acquérir de nouvelles séquences. Des mutations délétères peuvent également s'accumuler au sein de gènes et rendre les protéines instables, ce qui est compensé par l'apparition de nombreuses chaperonnes (Moran *et al.*, 2008; McCutcheon & Moran, 2012). La perte des gènes de réparation augmente également le taux de mutation (GC) → (AT), ce qui introduit un biais de séquences AT et entraîne une évolution accélérée (Moran *et al.*, 2008).

Aux stades ultimes de la réduction génomique, la frontière entre l'endosymbiote et l'organelle devient floue. La réduction génomique peut continuer avec le transfert de la régulation du cycle cellulaire à l'hôte (Mackiewicz, 2004; McCutcheon & Moran, 2012) ; le symbiote ne conserve alors que les gènes permettant la transcription, la traduction, et la réplication de son génome, ainsi que les gènes d'intérêt pour la symbiose. Chez *B. aphidicola*, on retrouve une amplification des gènes de synthèse des acides aminés, ce qui implique que le symbiote évolue de façon à remplir son rôle d'organelle métabolique de façon plus efficace (Moran *et al.*, 2008). Les endosymbiotes semblent donc évoluer vers fonction d'organelle métabolique, ayant délégué sa fonction de multiplication à l'hôte et développé une machinerie d'export des nutriments (McCutcheon & Moran, 2012). On retrouve ainsi des endosymbiotes primaires comme *Carsonella ruddii*, ayant un génome dégradé au point de ne plus pouvoir être considéré comme un organisme vivant mais comme une intermédiaire entre endosymbiote et organelle métabolique (Tamames *et al.*, 2007; Nakabachi *et al.*, 2006). Le génome du symbiote peut être dégradé au point que la symbiose devienne inefficace ; ainsi, on peut retrouver des traces de symbioses successives, ou un symbiote a été recruté pour en remplacer un autre (Koga *et al.*, 2013).

Conclusion

La génomique a apporté une meilleure compréhension des mécanismes d'évolution des génomes bactériens. Ainsi, les comparaisons génomiques ont montré que le transfert horizontal de gènes était chez les bactéries le principal moyen d'acquérir de nouvelles fonctions. Ces acquisitions peuvent être suivies d'une réduction génomique drastique lors de l'adaptation à l'environnement. L'étude des génomes bactériens réduits a également permis de comprendre comment les changements dans la pression de sélection entraînaient l'évolution.

IV- Génomique et facteurs de virulence

Les facteurs de virulence sont l'ensemble des déterminants permettant à une bactérie pathogène de causer une maladie (Finlay & Falkow, 1997; Wu, Wang, & Jennings, 2008). Les bactéries pathogènes sont les organismes les plus représentés dans les bases de données génomiques (Fraser-Liggett, 2005). A côté de la compréhension des mécanismes qui mènent une bactérie à devenir pathogène, il n'est donc pas étonnant que la recherche de nouveaux facteurs de virulence soit l'un des buts majeurs de la génomique appliquée aux pathogènes (ou pathogénomique).

A. Méthodes d'identification des facteurs de virulence

1. Les approches de génétique inverse

Deux méthodes ont été employées assez couramment pour décrire les facteurs de virulence avant que le séquençage massif ne s'impose : la mutagenèse aléatoire, et le clonage hétérologue. Il s'agit dans les deux cas d'approches de génétique inverse : on part du gène pour aboutir à un phénotype.

a. Mutagenèse par transposition

Dans le cas de la mutagenèse par transposition, on génère une banque de mutants, de façon à ce que chacun des gènes soit inactivé au moins une fois par l'insertion aléatoire d'un transposon dans le génome. Cette banque est ensuite criblée afin d'isoler les mutants dont la pathogénicité est diminuée (Suzuki *et al.*, 1994; Okada *et al.*, 1991), ou au contraire augmentée (Lee *et al.*, 1992) par rapport à celle de la souche sauvage. Le locus dans lequel le transposon est inséré est enfin localisé (Barquist *et al.*, 2013).

L'approche par mutagenèse aléatoire est encore employée chez des bactéries pour lesquelles peu d'outils génétiques sont disponibles (Cheng *et al.*, 2013; Stewart *et al.*, 2004; Bourhy *et al.*, 2005). Elle peut également être combinée avec les techniques de séquençage à haut débit : l'impact de chaque insertion sur la fitness est alors quantifié lors d'une compétition entre tous les mutants de la banque (van Opijnen *et al.*, 2009; van Opijnen & Camilli, 2012).

b. Banque de clones hétérologues

L'approche contraire de la mutagenèse aléatoire, le clonage hétérologue, consiste à étudier non plus ce qui se passe lorsque le gène est absent, mais son effet lorsqu'il est inséré dans un organisme hétérologue. On crée alors une banque de plasmides, chacun contenant un fragment du génome de l'organisme pathogène à étudier. Chaque plasmide est introduit dans un hôte hétérologue, et la banque de recombinants ainsi obtenue est criblée pour les phénotypes liés à la virulence (Isberg *et al.*, 1987; Roine *et al.*, 1998).

La combinaison de cette approche par clonage hétérologue avec le séquençage de génomes a donné naissance à la technique d'annotation rapide des gènes de virulence (RVA, *rapid virulence*

annotation). Lors de l'annotation d'un génome, cette technique permet d'assigner une fonction à des gènes de virulence, après avoir criblé la banque de recombinants pour un gain de toxicité dans plusieurs modèles différents (l'amibe *Acanthamoeba polyphaga*, le nématode *Caenorhabditis elegans*, l'insecte *Galleria mellonella*, et les macrophages de souris BALB/c) (Waterfield *et al.*, 2008).

2. Suivi de l'expression

Une autre façon d'identifier des facteurs de virulence est d'isoler les gènes qui ne sont exprimés qu'en conditions infectieuses. En particulier, deux techniques permettent de suivre les gènes exprimés dans l'hôte : l'IVET (*in vivo expression technology*) et, avec l'évolution du séquençage vers le haut débit, le RNA-Seq.

a. Technologie IVET

L'IVET repose sur l'infection d'un modèle par une banque de mutants auxotrophes pour la purine, dans lesquels a été réintégré au hasard le gène *purA* nécessaire à rétablir la prototrophie (Mahan *et al.*, 1993). Ainsi, *in vivo*, seuls les mutants dans lesquels le gène *purA* s'est intégré sous le contrôle d'un promoteur actif pendant l'infection seront capables de croissance. Cette approche a été utilisée pour des pathogènes d'animaux (*S. aureus* et un modèle souris (Lowe *et al.*, 1998); *B. cereus* et un modèle insecte (Fedhila *et al.*, 2006)) ou de plantes (Boch *et al.*, 2002)), mais également pour des bactéries commensales (Bron *et al.*, 2004). La méthode IVET reste encore utilisée pour des bactéries ne se multipliant que faiblement dans l'hôte, comme *Borrelia burgdorferi*, l'agent de la maladie de Lyme (Ellis *et al.*, 2013).

b. RNA-Seq

Le RNA-Seq est une technologie récemment développée, qui repose sur le séquençage à haut débit des ADNc obtenus à partir des ARNm bactériens (Kimbrel *et al.*, 2011; Pinto *et al.*, 2011). On peut ainsi comparer, qualitativement et quantitativement, les gènes exprimés par la bactérie pathogène dans son hôte avec les gènes exprimés en culture, et en tirer les gènes spécifiquement exprimés en conditions infectieuses. Un nombre croissant d'études utilisent maintenant le RNA-Seq afin d'identifier les gènes impliqués dans la virulence chez divers modèles comme *Burkholderia cenopacia* (Yoder-Himes *et al.*, 2009), *V. cholerae* (Mandlik *et al.*, 2011), une souche entérohémorragique d'*E. coli* (Sahl & Rasko, 2012), le pathogène de plante *Xanthomonas citri* (Jalan *et al.*, 2013) ou le pathogène d'insecte *Xenorhabdus nematophila* (Jubelin *et al.*, 2013). L'un des développements les plus intéressants de cette technique est la possibilité de séquencer dans le même temps le transcriptome du pathogène et celui de son hôte (Westermann *et al.*, 2012), ce qui permettra notamment de comprendre les mécanismes de défense de l'hôte, comment le pathogène subvertit ces défenses, mais aussi le tropisme de pathogènes pour certains types cellulaires.

3. Identification de facteurs de virulence par génomique comparative

Une autre façon de découvrir des facteurs de virulence bactériens est de comparer des souches virulentes et non-virulentes d'une même espèce, afin d'isoler les gènes spécifiques aux souches virulentes, en se fondant sur l'hypothèse que les gènes de virulence sont absents des souches non-virulentes. Nous présentons ici deux méthodes de comparaison génomique : les puces à ADN et la comparaison de séquences.

a. Comparaisons génomiques via les puces à ADN

La puce à ADN se compose de fragments d'ADN, les sondes, disposés en spots sur une surface solide. Les sondes sont des oligonucléotides représentant les séquences codantes d'un génome de référence, ou recouvrant l'ensemble de la séquence de génomique indépendamment de ces séquences codantes. La comparaison repose sur la compétition entre un ADN « contrôle » et un ADN « échantillon », chacun marqué avec un fluorochrome différent, pour l'hybridation aux sondes. Lors de la lecture de la puce, le spot d'une sonde représentée dans un seul des deux ADN aura la couleur d'un seul fluorochrome, alors que le spot d'une sonde présente dans les deux ADN aura la couleur de la fusion des deux fluorochromes (Dorrell *et al.*, 2005).

Plusieurs études de bactéries pathogènes ont utilisé des comparaisons génomiques par puces à ADN (Dorrell *et al.*, 2005; Garaizar *et al.*, 2006; Raskin *et al.*, 2006). Par exemple, chez *Xyllella fastidiosa*, un pathogène de plante, des facteurs de virulence ont ainsi pu être identifiés par comparaison entre une souche virulente et une souche non-virulente, sans qu'il y ait eu besoin de séquencer la souche non-virulente (Koide *et al.*, 2004). Les puces à ADN sont aussi indiquées pour identifier un *core-genome*, qui sera commun à tous les ADN hybridés, et des RGP présentes seulement dans certains ADN (Malloff *et al.*, 2001; Obert *et al.*, 2006). La comparaison de plusieurs souches de virulences variables permet enfin de détecter la présence de déterminants de virulence, comme chez *E. coli* (Bekal *et al.*, 2003), *P. aeruginosa* (Wolfgang *et al.*, 2003) ou *Nesseria* (Stabler *et al.*, 2005) et ainsi à terme de prédire si une souche nouvellement isolée sera pathogène ou non (Cosentino *et al.*, 2013).

b. Comparaison de génomes séquencés

Lorsque différentes souches plus ou moins virulentes de bactéries phylogénétiquement proches ont été séquencées, la comparaison de leur contenu génétique permet d'isoler des gènes présents uniquement chez les souches virulentes, c'est-à-dire les facteurs de virulence potentiels. Cette approche a par exemple permis l'identification d'ilots de pathogénicité chez *S. aureus* (Raskin *et al.*, 2006; Lindsay & Holden, 2004) ou *Rhodococcus equi* (Letek *et al.*, 2010), ou de gènes isolés chez divers pathogènes tels que *Vibrio fluvialis* (Lu *et al.*, 2014), *Vibrio nigripulchritudo* (Goudenège *et al.*, 2013), *Pasteurella multocida* (Johnson *et al.*, 2013), *Dickeya solani* (Pédron *et al.*, 2014) ou *Xanthomonas citri* (Jalan *et al.*, 2013).

L'approche de comparaison génomique est également l'une des seules utilisables dans le cas de bactéries non-cultivables (Kalman *et al.*, 1999).

Après identification de gènes de virulence potentiels par comparaison génomique, ils peuvent être mutés afin de voir si la virulence de la souche est atteinte (Rattanama *et al.*, 2012; Felsheim *et al.*, 2009). La complémentation de souches non-virulentes peut également être envisagée (Ellison *et al.*, 2008; González *et al.*, 2011; Goudenège *et al.*, 2013).

B. Impact de la génomique sur la notion de facteur de virulence

1. Les facteurs de virulence, des variations sur le même thème

L'étude de diverses espèces bactériennes a rapidement montré que certains mécanismes de virulence étaient conservés entre les espèces bactériennes. Les facteurs de virulence se répartissent en plusieurs grands groupes (Wu *et al.*, 2008; Gal-Mor & Finlay, 2006; Finlay & Falkow, 1997).

a. Adhésines

Les adhésines sont des protéines membranaires ou se situant à l'extrémité des pili. Elles permettent l'adhésion bactérienne aux surfaces (comme les muqueuses ou les cellules eucaryotes), et sont des facteurs de virulence primordiaux des pathogènes extracellulaires, responsables du tropisme de la bactérie (Finlay & Falkow, 1997; Klemm & Schembri, 2000). Cependant, elles se retrouvent également chez des bactéries non-pathogènes. Par exemple, chez *E. coli*, on retrouve l'adhésine FimH chez toutes les souches, même commensales. Une autre adhésine, PapG, codée par l'opéron *pap* présent sur un PAI, est responsable de la spécificité envers les muqueuses du système urinaire et n'existe que chez les souches uropathogènes (Kline *et al.*, 2009). D'autres adhésines, comme PilC chez *Nisseria* ou les TAA (*trimeric adhesin autotransporter*) présentes chez *Yersinia enterocolitica* ou *Haemophilus influenzae*, jouent également un rôle dans la virulence (Klemm & Schembri, 2000; Kline *et al.*, 2009).

b. Invasines

Les invasines sont une catégorie d'adhésines qui déclenche l'entrée de la bactérie dans la cellule hôte par différents moyens (Finlay & Falkow, 1997). La première invasine décrite est codée par le gène *inv* de *Yersinia pseudotuberculosis* (Isberg *et al.*, 1987). Chez *Y. enterocolitica*, on retrouve un locus, *ail*, codant également pour une adhésine (Falkow *et al.*, 1992). Chez *Salmonella*, *pagC* est un locus homologue à *ail* (Miller *et al.*, 1992).

c. Toxines

Les exotoxines sont des protéines, capables d'endommager les cellules à faible dose, secrétées par les bactéries pathogènes. Le LPS, ou endotoxine, est quant à lui une toxine non-protéique, qui est partie intégrante de la membrane des bactéries à Gram négatif. Bien que le LPS joue un rôle important dans la virulence (Morrison & Ryan, 1987; Finlay & Falkow, 1997), nous allons nous concentrer ici sur les exotoxines protéiques, qui peuvent être secrétées par les bactéries pathogènes à Gram positif ou négatif.

i. Toxines AB

Les toxines AB sont une large famille de toxines à deux sous-unités : la sous-unité B, variable, permet le ciblage et l'entrée dans les cellules et la sous-unité A, conservée, porte diverses activités enzymatiques. Ainsi, la sous-unité A de la toxine tétanique possède une activité protéolytique, et celle de la toxine diphtérique ou des shigatoxines ont une activité ADP-ribosyltransférase (Finlay & Falkow, 1997).

ii. Pore-forming toxins

Les « *pore-forming toxins* » (PFT), dont font partie les hémolysines, sont une autre grande famille de toxines. Elles sont secrétées sous la forme de monomères, qui se lient à la membrane de la cellule cible puis s'associent en multimères, formant un pore membranaire provoquant la lyse de la cellule cible (Los *et al.*, 2013). Les PFT, telles que l'hémolysine HlyA d'*E. coli*, l' α -hémolysine de *S. aureus* ou la cytolyse de *V. cholerae*, ont pour effet de rompre les barrières épithéliales de l'hôte et d'induire la mort de ses cellules immunitaires (Finlay & Falkow, 1997; Dhakal & Mulvey, 2012; Los *et al.*, 2013). Ainsi, chez les bactéries du genre *Xenorhabdus*, l'hémolysine *xaxAB* est une PFT induisant la nécrose et l'apoptose des hémocytes, les cellules immunitaires de l'insecte (Ribeiro *et al.*, 2003; Vigneux *et al.*, 2007).

iii. Superantigènes

Les superantigènes sont des toxines capables d'interférer avec les cellules immunitaires de l'hôte et de provoquer des chocs septiques (Llewelyn & Cohen, 2002). Chez *S. aureus*, on compte au total 23 superantigènes différents, dont Tst qui est responsable du choc toxique, chacun ciblant un type de cellule immunitaire spécifique (Grumann *et al.*, 2014). On retrouve également des superantigènes chez *Streptococcus pyogenes*, *Yersinia pseudotuberculosis* ou *Mycoplasma arthritidis* (Llewelyn & Cohen, 2002).

iv. Effecteurs des systèmes de sécrétion

Les effecteurs des systèmes de sécrétion de type III, IV ou VI sont des toxines aux rôles variés, directement injectées dans les cellules-cibles.

Ainsi, parmi les effecteurs du système de sécrétion de type III de *Yersinia* sp., YopE, YopP et YopJ activent la réaction inflammatoire de l'hôte ; YopT et YopH permettent la manipulation du cytosquelette d'actine, ce qui rompt l'attachement entre les cellules de l'hôte et empêche la phagocytose. Chez *P. aeruginosa*, ExoT et ExoY sont cytotoxiques. Enfin, chez les pathogènes de plante *Pseudomonas syringae* et *Xanthomonas campestris*, les effecteurs de type Avr provoquent l'apoptose ou la nécrose des cellules végétales (Galán & Collmer, 1999; Raymond *et al.*, 2013).

CagA, un effecteur du système de sécrétion de type IV chez *Helicobacter pylori*, active de nombreuses cascades de signalisation menant au réarrangement du cytosquelette d'actine et à une réaction inflammatoire. Chez *Legionella pneumophila*, RalF recrute un phagosome afin de faciliter la réplication intra-cellulaire (Backert & Meyer, 2006).

Enfin, certains effecteurs du système de sécrétion de type VI ciblent également les cellules eucaryotes : par exemple, la protéine VgrG de *V. cholerae* inhibe la phagocytose et son homologue chez *Aeromonas hydrophila* provoque l'apoptose (Filloux, 2013).

d. Systèmes de sécrétion

La sécrétion des facteurs de virulence se fait par différents types de transporteurs. Certains empruntent les systèmes de sécrétion de type I ou II, comme l'hémolysine HlyA d'*E. coli* (Finlay & Falkow, 1997; Wu *et al.*, 2008). D'autres sont injectés dans les cellules-cibles par des systèmes contact-dépendants : les systèmes de sécrétion de type III, IV, V et VI (Hayes *et al.*, 2010).

i. Systèmes de sécrétion de type III

Le système de sécrétion de type III (T3SS) possède une structure homologue à celle du flagelle (He *et al.*, 2004; Hayes *et al.*, 2010) : une aiguille, composée de sous-unités (MxiH chez *Salmonella*, YcsF chez *Yersinia* ou HrpA chez *P. syringae*) est ancrée dans la paroi de la bactérie et permet l'injection d'effecteurs dans la cellule hôte (Galán & Collmer, 1999; Raymond *et al.*, 2013). Le T3SS se compose d'une vingtaine de protéines au total, dont plusieurs sont homologues parmi les bactéries pathogènes ainsi que chez différentes bactéries symbiotiques (He *et al.*, 2004). Leurs gènes se situent en général dans des îlots de génomiques, ce qui suggère une diffusion probable des T3SS au sein des bactéries par transfert horizontal.

ii. Systèmes de sécrétion de type IV

Le système de sécrétion de type IV (T4SS) est impliqué dans la transmission d'ADN lors de la conjugaison (voir Chapitre I), mais également dans l'injection d'effecteurs dans le cytoplasme de l'hôte. Chez *Agrobacterium tumefaciens*, le T4SS permet d'injecter de l'ADN oncogène dans les cellules de la plante infectée, menant à la formation d'une tumeur (Voth *et al.*, 2012; Hayes *et al.*, 2010).

iii. Système de sécrétion de type V

Les systèmes de sécrétion de type V (T5SS) sont composés de protéines auto-transportrices (Leo *et al.*, 2012), dont la sécrétion dépend, ou non, d'un contact avec une cellule-hôte :

- Dans les T5SS ne dépendant pas d'un contact, le domaine C-terminal de la protéine sécrétée s'insère dans la membrane externe de la bactérie et y forme un pore, puis le reste de la protéine se replie à travers ce pore. Des adhésines d'*E. coli* ou de *B. pertussis*, ainsi que des protéases ou des lipases sont sécrétées via ce système (Leo *et al.*, 2012). Dans le cas de certains T5SS, les TPS (*Two-partner secretion system*), c'est une protéine de la famille TpsB qui s'insère dans la membrane et permet la sécrétion de la protéine TpsA (Hayes *et al.*, 2010; Leo *et al.*, 2012). Ainsi, l'hémolysine PhIA de la bactérie entomopathogène *Photorhabdus luminescens* est sécrétée via un système TPS (Brillard *et al.*, 2002).
- Certains systèmes TPS permettent l'inhibition de contact des bactéries compétitrices : c'est le mécanisme de CDI (*Contact-dependant inhibition*). Chez *E. coli*, la protéine CdiA, appartenant à la famille TpsA, reste reliée à CdiB jusqu'à sa rencontre avec une bactérie compétitrice. CdiA est alors internalisée et inhibe la croissance du compétiteur (Hayes *et al.*, 2010).

iv. Système de sécrétion de type VI

Le système de sécrétion de type VI (T6SS), récemment décrit, a une structure « queue de phage » et semble issu de l'intégration de gènes phagiques au processus de virulence (Filloux, 2013; Records, 2011). Le T6SS permet d'injecter des toxines dans des cellules eucaryotes ou dans des bactéries compétitrices. Il joue donc un rôle dans la compétition inter-bactérienne (Filloux, 2013 ; Records, 2011).

iv. Vésicules de membrane externe

Les vésicules de membrane externe (OMV, *Outer Membrane Vesicles*) sont issues du bourgeonnement de la membrane externe des bactéries Gram-négatives. Leur rôle est encore mal défini : chez les pathogènes, les OMV sont impliquées dans la livraison de facteurs de virulence dans la cellule-hôte; elles jouent également un rôle dans la compétition inter-bactérienne (Lee *et al.*, 2008; Berleman & Auer, 2013; Bonnington & Kuehn, 2014).

e. Les sidérophores

L'acquisition du fer est primordiale pour la croissance bactérienne. Les sidérophores ont une affinité très forte pour le fer, et peuvent ainsi lier le fer soluble ou celui attaché aux molécules (transferrine, hémoglobine ou ferritine) de l'hôte (Ratledge & Dover, 2000). Les sidérophores sont donc un facteur de virulence essentiel à l'établissement de la pathologie. Parmi eux, on retrouve par exemple

l'entérobactine (entérobactéries), la pyocheline (*P. aeruginosa*) ou l'aérobactine (*E. coli* et *Shigella* spp.) (Ratledge & Dover, 2000; Miethke & Marahiel, 2007).

f. Les régulateurs

La production et la sécrétion des facteurs de virulence sont régulées afin de n'avoir lieu qu'au moment requis dans le processus infectieux. Un certain nombre de *stimuli* spécifiques de l'hôte activent donc des systèmes à deux composantes bactériens (Finlay & Falkow, 1997). Ces systèmes se composent d'un senseur membranaire, capable de reconnaître le stimulus, et d'un régulateur de la transcription. Deux de ces systèmes les mieux décrits sont EnvZ/OmpR (Forst & Roberts 1994) et PhoPQ (Garcia Vescovi *et al.*, 1994). A côté des systèmes à deux composantes, Il existe d'autres régulateurs de la virulence, comme les régulateurs de type AraC (Finlay & Falkow, 1997; Yang *et al.*, 2011) ou de type LysR (Finlay & Falkow, 1997; Maddocks & Oyston, 2008). Enfin, le quorum-sensing joue un grand rôle dans l'expression des facteurs de virulence, qui ne sont alors exprimés que lorsque la population bactérienne atteint une forte densité (Finlay & Falkow, 1997; Rutherford & Bassler, 2012).

g. Redondance des facteurs de virulence

Les facteurs de virulence précédemment décrits sont communs aux pathogènes de vertébrés, d'invertébrés et de plantes. Ainsi, *P. aeruginosa* est un pathogène de mammifère, mais est également capable d'infecter *Arabidopsis thaliana* : l'exotoxine *toxA*, capable d'inhiber la traduction chez l'hôte, la phospholipase *plcS*, qui dégrade les phospholipides des cellules eucaryotes, et le régulateur global *gacA*, qui régule la sécrétion des facteurs de virulence, sont impliqués dans la virulence envers les deux modèles (Rahme *et al.*, 1995). Chez *S. enterica*, l'implication des effecteurs du T3SS dans l'infection des plantes a été montrée (Schikora *et al.*, 2011).

2. Comment définir un facteur de virulence ?

Pour définir quels gènes sont des facteurs de virulence, on se base sur une version moléculaire du postulat de Koch (Falkow, 1988; Pallen & Wren, 2007) :

- Un gène de virulence doit être présent chez les souches virulentes, et absent des souches non-virulentes.
- L'inactivation d'un gène de virulence doit provoquer l'atténuation de la pathologie chez l'hôte.
- La réintroduction de ce gène dans le mutant doit restaurer la virulence bactérienne.

Cependant, avec l'augmentation du nombre et de la variété des génomes disponibles, plusieurs gènes de « virulence » ont été découverts dans des bactéries commensales ou symbiotiques (Hentschel *et al.*, 2000; Wassenaar & Gastra, 2001; Pallen & Wren, 2007). Les T3SS et leurs effecteurs se retrouvent par exemple dans le symbionte de légumineuses *Rhizobium* sp. (Kambara *et al.*, 2009); les souches commensales d'*E. coli* expriment des adhésines; enfin, *Vibrio fischeri* possède des toxines et est capable d'induire l'apoptose des cellules de son hôte (Ruby *et al.*, 2005; Foster & McFall-Ngai, 1998). Les gènes de virulence, ceux qui permettent l'établissement d'une symbiose et ceux qui permettent une interaction commensale avec un hôte semblent donc se confondre. En effet, dans ces trois cas, le but est d'interagir avec un hôte et implique des mécanismes communs (Hentschel *et al.*, 2000).

Certains facteurs de virulence, comme les toxines cholérique, diphtérique, sont suffisants à causer une pathologie et correspondent au postulat moléculaire de Koch. Cependant, une grande majorité de « facteurs de virulence » sont en réalité des facteurs d'interaction avec l'hôte (adhésines, systèmes de sécrétion, modulation du système immunitaire), communs aux bactéries pathogènes, symbiotiques et commensales. La virulence de nombreuses bactéries repose ainsi sur une combinaison de facteurs d'interaction avec l'hôte. Le tropisme envers certains tissus et la susceptibilité de l'hôte jouent également un rôle dans l'établissement de la pathologie (Hentschel *et al.*, 2000). Par exemple, les souches uropathogènes d'*E. coli* sont semblables génétiquement aux souches commensales, mais sécrètent une adhésine spécifique et un sidérophore qui permet leur survie dans le milieu urinaire, ce qui entraîne une infection (Brzuszkiewicz *et al.*, 2006). De la même façon, *S. aureus* est en règle générale un commensal de la peau, et plusieurs facteurs (rupture de la barrière cutanée, réponse immunitaire et flore cutanée de l'hôte) vont jouer sur l'établissement d'une infection (Johannessen *et al.*, 2012).

Conclusion

Les analyses de comparaison génomique ont donc montré la redondance des facteurs de virulence entre les bactéries pathogènes de vertébrés, d'invertébrés et de végétaux. De plus, la plupart des facteurs dits « de virulence » se retrouvent aussi bien dans des bactéries pathogènes que des bactéries commensales ou symbiotiques. Ainsi, la génomique a mis en évidence des mécanismes d'interaction communs à toutes les bactéries associées à un hôte, et a obligé à redéfinir la notion de « facteur de virulence ».

Conclusion : la génomique comme science.

En 20 ans, les analyses génomiques ont transformé notre vision du génome bactérien.

Elles ont tout d'abord montré que le génome n'est pas qu'une somme de gènes, mais que l'architecture a également son importance. Ainsi, les gènes ne sont pas disposés au hasard sur le chromosome bactérien, et leur répartition est influencée par le processus de réplication. Les gènes ont de plus tendance à s'organiser en clusters fonctionnels facilement mobilisables lors des événements de transfert horizontal. L'analyse des génomes a introduit l'idée que l'objet de la sélection naturelle n'était pas un seul gène, mais les clusters fonctionnels (Lawrence & Roth, 1996) voire le génome entier (Heng, 2009).

Alors que les génomes bactériens, avec leur reproduction non-sexuée, étaient considérés comme moins variables que ceux des eucaryotes, la science génomique a mis en évidence l'importance des transferts horizontaux entre bactéries ainsi que l'énorme plasticité de leurs génomes (Gogarten *et al.*, 2002; Levin & Bergstrom, 2000). La notion d'espèce bactérienne est ainsi fortement débattue. Deux visions s'affrontent donc : d'une part, une vision de l'espèce bactérienne comme un cluster de populations incapable de se recombiner avec les autres clusters, comme pour les espèces à reproduction sexuée (Cohan, 2002) ; d'autre part, une vision de « réseaux bactérien », dans lesquels l'incidence du transfert horizontal est trop forte pour pouvoir diviser clairement les populations bactériennes en espèces (Doolittle & Papke, 2006).

Le transfert horizontal de gènes est le moteur d'une évolution bactérienne en « bonds quantiques » : l'acquisition d'îlots génomiques permet en effet une adaptation immédiate à une niche écologique (Groisman & Ochman, 1996). Dans leur nouvelle niche écologique, les génomes subissent des variations de pression de sélection qui mènent à une réduction de leur taille (Giovannoni *et al.*, 2014). La découverte récente de transferts horizontaux entre bactéries et eucaryotes, ou entre eucaryotes (Dunning Hotopp *et al.*, 2007; Robinson *et al.*, 2013; Tucker, 2013) ainsi que de génomes réduits chez les eucaryotes (Kelley *et al.*, 2014; Wolf & Koonin, 2013) montre que ces mécanismes d'évolution génomique ne se limitent pas aux bactéries, mais sont en réalité universels.

L'importance du transfert horizontal dans l'évolution bactérienne explique la redondance des facteurs de virulence : un même gène peut, en se propageant par transfert horizontal, être présent dans plusieurs bactéries sans que sa séquence ne change. De plus, les études de pathogénomique ont montré que les gènes de virulence étaient pour la plupart des facteurs d'interaction avec un hôte, également présents dans les bactéries pathogènes et commensales (Pallen & Wren, 2007).

Ainsi, la mise en place d'une pathologie fait intervenir une somme de facteurs d'interactions bactériens, et dépend également de la réaction de l'hôte à l'infection (Hentschel *et al.*, 2000).

Dans cette thèse, les notions développées dans cette introduction ont été utilisées pour étudier l'évolution du génome ainsi que la mise en place de la virulence chez un genre bactérien pathogène d'insecte, *Xenorhabdus*.

**Le modèle : les bactéries entomopathogènes du genre
*Xenorhabdus***

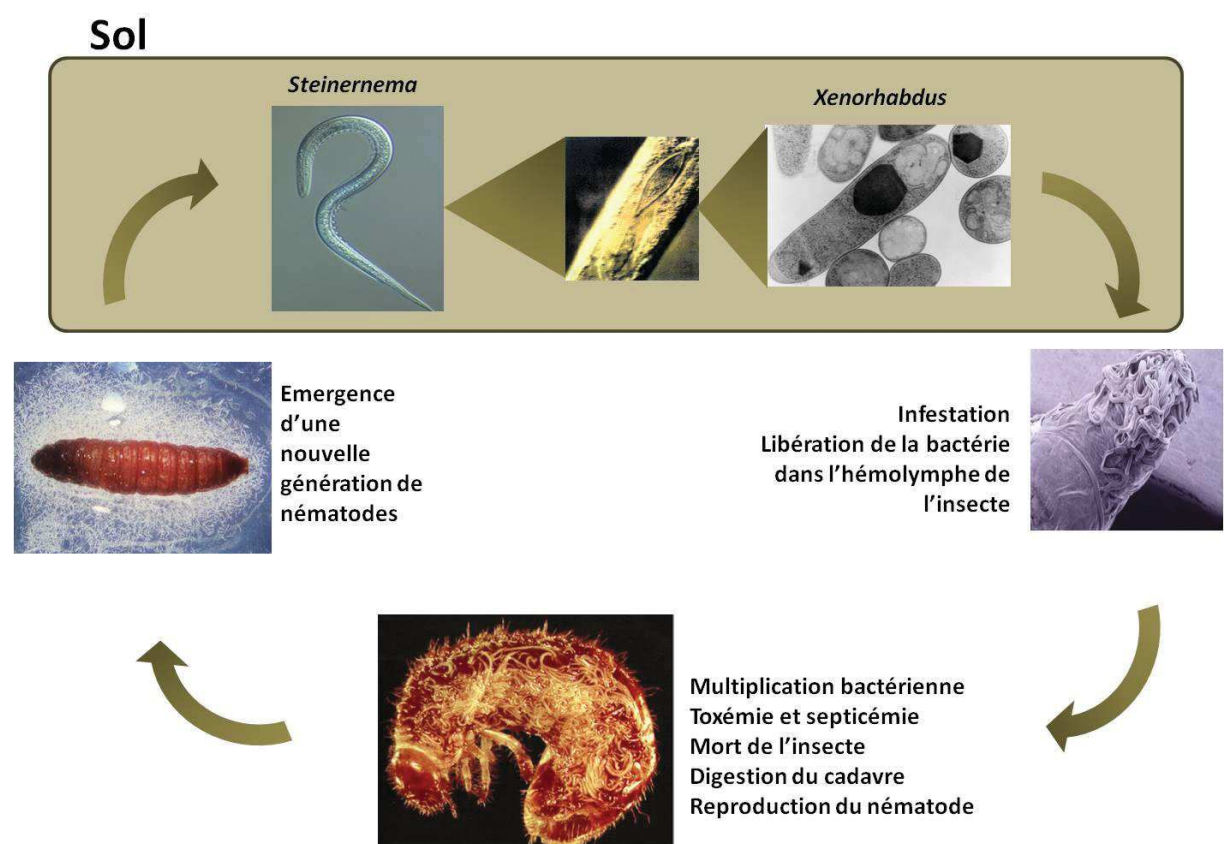


Figure 9. Cycle de vie du couple *Steinernema-Xenorhabdus*.

Le modèle étudié est le genre bactérien *Xenorhabdus*. Ces bactéries sont des symbiontes intestinaux des nématodes du genre *Steinernema* (Thomas & Poinar, 1979; Poinar & Thomas, 1966). Les couples *Steinernema-Xenorhabdus* sont pathogènes pour un large spectre d'insectes (Gaugler, 2002; Kaya & Gaugler, 1993).

I- La symbiose némato-bactérienne *Steinernema-Xenorhabdus* (Figure 9)

La forme *infective juvenile* (IJ) du nématode se trouve dans le sol et contient, dans un réceptacle au niveau de l'intestin antérieur, un nombre variable de bactéries (Kim *et al.*, 2012; Chaston *et al.*, 2013 ; Sugar *et al.*, 2011). L'IJ est capable de pénétrer dans un insecte et libère *Xenorhabdus* dans son hémolymphe (l'équivalent du sang chez l'insecte)(Stock & Goodrich Blair, 2008; Sicard *et al.*, 2004a; Poinar & Thomas, 1966). L'hémolymphe constitue un milieu de croissance pour la bactérie, qui cause une septicémie et une toxémie, entraînant la mort de l'insecte en 24 à 48 heures (Boemare, 2002; Poinar & Thomas, 1967). Après la mort de l'insecte, l'action d'enzymes bactériennes permet la dégradation du cadavre, fournissant ainsi des nutriments nécessaires au passage de la forme IJ à l'état adulte et à la reproduction du nématode. Lorsque les nutriments présents dans le cadavre de l'insecte sont épuisés, les nématodes repassent sous leur forme IJ et se réassocient spécifiquement avec leurs bactéries natives. Les IJ émergent du cadavre de l'insecte et repartent dans le sol à la recherche d'une nouvelle proie (Goodrich-Blair & Clarke, 2007; Poinar 1990; Stock & Goodrich Blair, 2008).

II- *Xenorhabdus nematophila*, un modèle pour le genre *Xenorhabdus*

Xenorhabdus nematophila est pathogène par injection directe dans l'hémolymphe de l'insecte (Sicard *et al.*, 2004a; Poinar & Thomas, 1967). Elle représente pour cette raison le modèle le plus employé pour décrire les mécanismes de virulence bactériens au sein du genre *Xenorhabdus* (Herbert & Goodrich-Blair, 2007; Nielsen-LeRoux *et al.*, 2012). Cette partie décrit les différentes étapes du cycle de vie bactérien et les principaux facteurs d'adaptation découverts chez la bactérie modèle *X. nematophila*.

A. Entrée de *X. nematophila* dans l'hémolymphe et contournement du système immunitaire

1. Libération de *X. nematophila* par *S. carpocapsae*

Les nématodes du genre *Steinernema* pénètrent dans les larves d'insectes *via* les orifices naturels (bouche, anus, stigmates trachéens) et sont visibles dans l'intestin de l'insecte infesté 3 à 5 heures après l'infestation. *X. nematophila* quitte alors l'intestin du nématode et est injectée à travers la paroi intestinale dans l'hémolymphe de l'insecte (Sicard *et al.*, 2004a). On assiste d'abord à une diminution du nombre de bactéries présentes dans l'insecte (la *clearance*), probablement due à la

réaction immunitaire de l'insecte, entre 1 et 6 heures après l'arrivée de la bactérie dans l'hémolymphe (Dunphy & Webster, 1984; Sicard *et al.*, 2004a).

2. Résistance de la bactérie à l'immunité de l'insecte

Le système immunitaire de l'insecte comprend une composante cellulaire et une composante humorale (Gillespie *et al.*, 1997), auxquelles *Xenorhabdus* doit résister pour se multiplier.

a. Résistance à l'immunité cellulaire de l'insecte

L'immunité cellulaire de l'insecte repose sur l'action des hémocytes, capables de phagocyter ou d'encapsuler les pathogènes (Gillespie *et al.*, 1997). *X. nematophila* produit des toxines capables d'induire l'apoptose et/ou la nécrose des hémocytes (Nielsen-LeRoux *et al.*, 2012). Ainsi, *X. nematophila* possède deux homologues du locus *mcf* (*makes caterpillar floppy*) présent chez *Photorhabdus*, un genre entomopathogène proche (Sugar *et al.*, 2012). Chez *Photorhabdus luminescens*, la toxine Mcf provoque l'apoptose des hémocytes, et une souche commensale d'*E. coli* surproduisant Mcf devient capable de tuer les insectes par injection intra-hémocoelique (Daborn *et al.*, 2002). *X. nematophila* contient aussi les gènes *xptABC*, homologues au complexe qui code les toxines insecticides Tc chez *P. luminescens* (Sheets *et al.*, 2011). Les toxines de la famille TcC de *P. luminescens* ont une activité ADP-ribosyltransférase, et sont capables d'altérer le cytosquelette d'actine des hémocytes afin d'altérer la phagocytose (Lang *et al.*, 2010). Deux hémolysines ayant une activité anti-hémocytaire, XhIA et XaxAB, ont également été caractérisées chez *X. nematophila* (Brillard *et al.*, 2001; Cowles & Goodrich-Blair, 2005). XhIA est associée à la surface bactérienne et permet la lyse des hémocytes (Cowles & Goodrich-Blair, 2005). XaxAB se compose quant à elle de deux sous-unités sécrétées indépendamment, qui s'assemblent en une toxine formant des pores membranaires (Ribeiro *et al.*, 2003). A faible dose, XaxAB induit l'apoptose des hémocytes de l'insecte ; à forte dose, elle induit leur nécrose (Vigneux *et al.*, 2007).

b. Résistance à l'immunité humorale de l'insecte

L'immunité humorale de l'insecte se compose de facteurs solubles: les peptides antimicrobiens produits par les hémocytes (les cellules immunitaires présentes dans l'hémolymphe) ainsi que le corps gras de l'insecte, et le système phénoloxydase.

i. Résistance aux peptides antimicrobiens

Les peptides antimicrobiens, comme la cécropine, ont généralement pour cible la membrane bactérienne où ils forment des pores provoquant la lyse bactérienne (Lemaitre & Hoffmann, 2007). *In vitro*, *X. nematophila* est sensible aux peptides antimicrobiens (Duvic *et al.*, 2012). Cependant, *in vivo*, *X. nematophila* est capable de bloquer la transcription des gènes codant la cécropine via un mécanisme encore inconnu (Ji & Kim, 2004; Duvic *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2003). La cécropine peut également être dégradée par une protéase sécrétée par la bactérie (Caldas *et al.*, 2002).

ii. Résistance au système phénoloxydase

Le système phénoloxydase a pour but l'encapsulation et la mélanisation des pathogènes. Lorsqu'un pathogène est reconnu par ce système, la phénoloxydase est activée par un clivage protéolytique et catalyse la transformation de composés phénoliques en mélanine (Cerenius & Söderhäll, 2004). *X. nematophila* supprime la réaction d'encapsulation des pathogènes (Park *et al.*, 2003; Sicard *et al.*, 2004a). Elle est également capable d'inhiber l'action de la phénoloxydase, probablement en produisant des molécules compétitrices des substrats de cette enzyme, telles que la benzylidèneacétone (BZA) ou la rhabduscine (Song *et al.*, 2011; Crawford *et al.*, 2012).

B. Multiplication bactérienne dans l'hémolymphe et mort de l'insecte

1. Mise en place de la septicémie et formation d'agrégats bactériens

Après la phase de *clearance*, *X. nematophila* se multiplie fortement dans l'hémolymphe (Dunphy & Webster, 1984; Sicard *et al.*, 2004a). Il se forme également des agrégats bactériens extracellulaires au sein du tissu conjonctif qui entoure l'intestin de l'insecte (Sicard *et al.*, 2004a). A partir de 10^8 bactéries dans l'hémolymphe, la septicémie conduit à la mort de l'insecte, environ 30h après la libération des bactéries dans l'hémolymphe (Jubelin *et al.*, 2011; Sicard *et al.*, 2004a).

2. Sécrétion de toxines

X. nematophila sécrète plusieurs protéines possédant une activité toxique et ayant un rôle possible dans la mort de l'insecte. Ainsi, les toxines Tc inhibent la croissance de l'insecte et ont une activité insecticide par ingestion à forte dose (Morgan *et al.*, 2001; Sheets *et al.*, 2011; Sergeant *et al.*, 2006). MrxA, une adhésine de *X. nematophila*, possède également une activité *pore-forming toxin* (Khandelwal *et al.*, 2004). La toxine Mcf, en plus de son activité contre les hémocytes, endommage également l'intestin de l'insecte (Daborn *et al.*, 2002; Nielsen-LeRoux *et al.*, 2012).

C. Dégradation du cadavre de l'insecte

Après la mort de l'insecte, *X. nematophila* dégrade son cadavre. Les nutriments ainsi générés permettent la multiplication du nématode. Dans le même temps, la bactérie sécrète diverses molécules permettant l'inhibition de ses compétiteurs.

1. Acquisition des nutriments

Plusieurs exoenzymes sécrétées par *Xenorhabdus* vont permettre la dégradation du cadavre de l'insecte (Nielsen-LeRoux *et al.*, 2012; Richards & Goodrich-Blair, 2009). Ainsi, *in vivo*, les hémolysines XhIA et XaxAB, sont sécrétées après la mort de l'insecte et jouent probablement un rôle dans l'acquisition des nutriments (Jubelin *et al.*, 2011; Cowles & Goodrich-Blair, 2005). Une lipase, XlpA, est également nécessaire à la multiplication du nématode (Richards & Goodrich-Blair, 2010).

2. Inhibition des compétiteurs

Lors de sa dégradation par *X. nematophila*, le cadavre de l'insecte peut être contaminé par les nombreux microorganismes situés dans le sol ou associés à l'insecte. *Xenorhabdus* sécrète de nombreux composés antimicrobiens permettant d'éliminer ces compétiteurs. Les xénocoumacines, des métabolites composites (peptides à synthèse non-ribosomique et polykétides) sont les principaux composés antimicrobiens produits par *X. nematophila*, actifs contre un large spectre de bactéries ainsi que certains champignons (McInerney *et al.*, 1991). Un cluster de 14 gènes (*xncA-N*) NRPS/PKS (*non-ribosomal peptide synthetase/polyketide synthase*), code une chaîne d'assemblage enzymatique qui assure la synthèse des xénocoumacines sans passer par le ribosome (Park *et al.*, 2009). Un autre composé antimicrobien, la xenorhabdicine, a une structure « queue de phage » et est codé par un locus prophagique (Morales-Soto *et al.*, 2012; Thaler *et al.*, 1995). Une chitinase, détectée chez plusieurs espèces de *Xenorhabdus*, est quant à elle très active contre les champignons (Chen *et al.*, 1996).

D. Réassociation avec le nématode

Une fois les nutriments du cadavre de l'insecte épuisés, *Steinernema* et *Xenorhabdus* se réassocient. L'adhésine MrxA semble jouer un rôle dans la colonisation de la vésicule du nématode par la bactérie, mais sa nécessité reste incertaine (Chandra *et al.*, 2008; Snyder *et al.*, 2011). Les gènes *nilABC* sont en revanche cruciaux dans la spécificité de l'association entre *S. carpocapsae* et *X. nematophila* (Cowles & Goodrich-Blair, 2008). Cette spécificité pourrait également être renforcée par l'action de la xenorhabdicine, qui est active principalement contre les souches proches de *Xenorhabdus* (Sicard *et al.*, 2005).

E. Régulation du cycle

Au cours du cycle de vie de *X. nematophila*, l'expression des différents facteurs d'adaptation est finement régulée. Il existe ainsi trois régulateurs globaux, *lrp*, *lrhA* et *cpxR*, qui contrôlent la transition entre les phases de virulence envers l'insecte et d'établissement de la symbiose avec le nématode (Richards & Goodrich-Blair, 2009). L'opéron *fliAZ*, qui est sous le contrôle de *lrp* et de *lrhA*, permet la régulation de la mobilité bactérienne et de l'expression des toxines (Jubelin *et al.*, 2011; Lanois *et al.*, 2008). Bien que son rôle ait été peu étudié, le quorum-sensing semble également primordial dans la régulation de la virulence chez *X. nematophila* (Dunphy *et al.*, 1997).

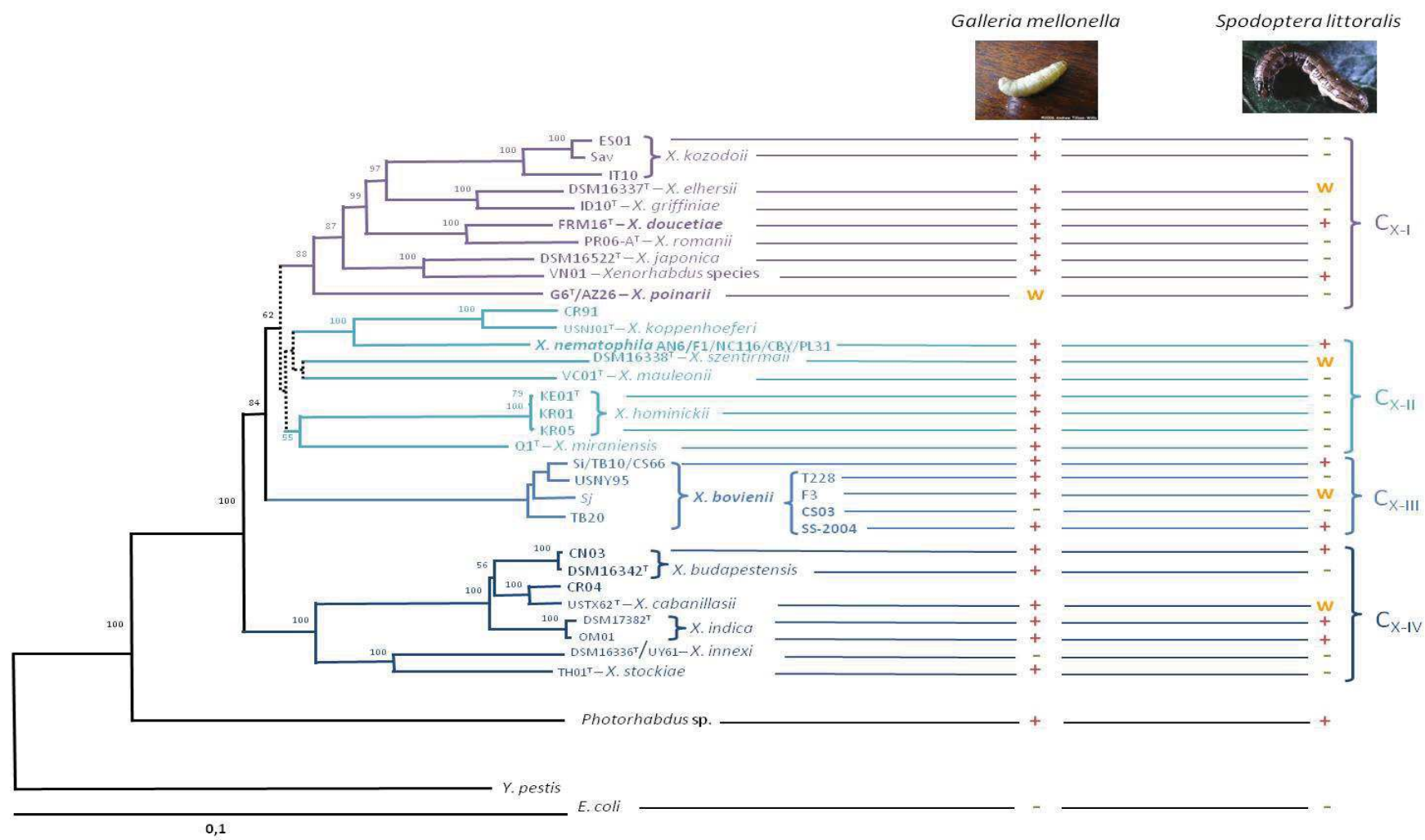


Figure 10. Phylogénie et virulence comparée des souches de *Xenorhabdus* (Sylvie Pagès, données non publiées). La virulence de chaque souche a été testée par l'injection de 10^3 bactéries dans l'hémocoèle des insectes modèles *Galleria mellonella* et *Spodoptera littoralis*. Les clades (Cx-I-IV) correspondent à ceux proposés par Tailliez *et al.*, (2010). Les souches dont le génome est disponible sont indiquées en gras. + : souche virulente ; - : souche non-virulente ; w : virulence atténuée.

III- Un aperçu de la diversité des associations *Xenorhabdus-Steinernema*

A. Phylogénie et spécificité des associations *Xenorhabdus-Steinernema*

Les couples *Steinernema-Xenorhabdus* sont présents dans le monde entier (Tailliez *et al.*, 2006; Lee & Stock, 2010a; Spiridonov *et al.*, 2004a). L'analyse phylogénétique du genre *Xenorhabdus* montre une division en quatre clades (C_{XI-IV}) (Figure 10 ; Tailliez *et al.*, 2010). Les nématodes du genre *Steinernema*, quant à eux, peuvent se diviser en cinq clades différents (Nadler *et al.*, 2006; Spiridonov *et al.*, 2004a). En revanche, la comparaison des phylogénies de *Xenorhabdus* et *Steinernema* laisse à penser que de multiples changements d'hôte *Steinernema* ont eu lieu lors de l'évolution de *Xenorhabdus* (Lee & Stock, 2010b). Les associations *Xenorhabdus-Steinernema* sont néanmoins très spécifiques : l'association du nématode avec une souche bactérienne non-native impacte ainsi sa capacité à se multiplier dans l'hôte ou sa survie (Chapuis *et al.*, 2009; Sicard *et al.*, 2004b).

B. La virulence des associations *Xenorhabdus-Steinernema*

Les couples *Steinernema-Xenorhabdus* sont dissociables en conditions de laboratoire, ce qui permet d'étudier la virulence individuelle de chacun des partenaires. Ainsi, *X. nematophila* et son symbiote, *Steinernema carpocapsae*, sont virulents individuellement : l'injection de moins de 20 bactéries dans l'hémolymphe suffit à tuer un insecte (Sicard *et al.*, 2004a; Poinar & Thomas, 1967), et le nématode aposymbiotique (ne contenant pas de *Xenorhabdus* dans son réceptacle) est également virulent, bien que sa reproduction soit alors moins efficace (Han & Ehlers, 2000; Simões *et al.*, 2000; Sicard *et al.*, 2003). Cependant, l'étude d'autres associations, comme celle entre *Xenorhabdus poinarii* et *Steinernema glaseri*, a montré que ce cas n'était pas généralisable. En effet, lorsque l'on dissocie le couple *X. poinarii-S. glaseri*, chacun des deux partenaires est non-virulent (Akhurst, 1986) ; seul le couple est capable de tuer puis de se multiplier dans un insecte. Il existe donc une forte dépendance entre *X. poinarii* et *S. glaseri*, chacun pouvant assurer une partie de l'ensemble des fonctions nécessaires à la virulence.

Dans notre laboratoire, la virulence de différentes souches de *Xenorhabdus* a été testée en injectant directement 10³ bactéries dans l'hémocoèle de larves des lépidoptères modèles *Galleria mellonella* et *Spodoptera littoralis*, puis en évaluant la TL₅₀ (temps nécessaire pour atteindre 50% de mortalité chez les insectes injectés). La virulence de *Xenorhabdus* est variable d'une souche à l'autre : les souches entraînant une mortalité forte et rapide de nos insectes modèles (TL₅₀ ≤ 20-25 heures) sont dites virulentes, par opposition aux souches non-virulentes qui entraînent peu ou pas de mortalité des larves d'insecte (TL₅₀ ≥ 80 heures). Il existe également des souches dites atténuées, entraînant une mortalité intermédiaire. Après ce criblage, nous avons pu constater que des souches non-virulentes étaient présentes au sein de tous les clades phylogénétiques de *Xenorhabdus* (Figure 10).

Ainsi, l'interaction entre nématode et bactérie est plus ou moins forte selon l'association *Steinernema-Xenorhabdus*. Il est donc nécessaire de caractériser la pathogénicité de plusieurs associations, et de chaque partenaire individuellement afin d'avoir une description plus complète des interactions *Steinernema-Xenorhabdus*. A l'occasion de cette thèse, j'ai mené l'étude de la pathologie causée une de ces associations, *Steinernema-Xenorhabdus*, impliquant la souche non-virulente *X. bovienii* CS03 et son nématode associé *S. weiseri* 583 (voir Chapitre 2 des résultats).

C. La diversité des génomes chez *Xenorhabdus*

Au début de cette thèse, deux génomes de *Xenorhabdus* complets avaient été publiés : ceux des souches virulentes *X. nematophila* (souche ATCC19061) et *X. bovienii* (souche SS-2004). *X. nematophila* possède un chromosome de 4,43 Mb ainsi qu'un plasmide de 155 Kb ; *X. bovienii* SS-2004 contient quant à elle un chromosome de 4,22 Mb (Latreille *et al.*, 2007; Chaston *et al.*, 2011).

Durant cette thèse, j'ai été impliquée dans la description de génomes supplémentaires au travers de deux comparaisons génomiques :

- Une comparaison génomique entre les génomes des souches *X. poinarii* G6 et *X. doucetiae* FRM16 (voir Chapitre 1 des résultats). Ce travail décrit un exemple de réduction génomique au sein d'une espèce entière. Mon implication dans ce travail a porté sur l'annotation des génomes de *X. poinarii* G6 et de *X. doucetiae* FRM16 ainsi que sur la comparaison de leur contenu en systèmes toxine-antitoxine.
- Une comparaison génomique entre le génome de la souche *X. bovienii* CS03 et celui de la souche *X. bovienii* SS-2004 (voir Chapitre 3 des résultats). Ce travail décrit un exemple d'expansion génomique au sein d'une souche particulière. J'ai mené cette comparaison entièrement, avec le concours de Jean-Claude Ogier, ingénieur d'étude au laboratoire DGIMI.

D. La diversité des facteurs de virulence de *Xenorhabdus*

Les facteurs de virulence précédemment décrits ont presque tous été découverts chez *X. nematophila*. Or, il est possible que ces facteurs de virulence ne soient pas toujours présents dans d'autres souches de *Xenorhabdus*, comme par exemple les souches non-virulentes de *Xenorhabdus* (voir exemples ci-dessus). La mise en place de comparaisons génomiques entre souches virulentes et non-virulentes par injection pourrait permettre l'identification d'un *core-genome* de virulence. Durant cette thèse, j'ai mené ce travail de comparaison et engagé un travail de validation fonctionnelle de ces facteurs (Chapitre 4 des résultats).

Résultats

Chapitre 1 : Description génomique de la souche non-virulente *X. poinarii G6*

Lorsque les couples *S. glaseri*-*X. poinarii* sont dissociés, chacun des deux partenaires est non-virulent ou faiblement virulent individuellement (Akhurst 1986; Rosa *et al.*, 2002; Ansari *et al.*, 2003). Il semble ainsi exister une forte dépendance au sein de ces symbioses nématode-bactériennes. Nous avons donc décidé de mener une étude pathologique et génomique de la souche *X. poinarii G6* (*Xp G6*) afin de comprendre quels processus avaient entraîné cette forte complémentarité avec le nématode.

I- *X. poinarii G6* a subi une réduction génomique

Ce paragraphe s'appuie sur l'article 1 : Jean-Claude Ogier, Sylvie Pagès, Gaëlle Bisch, Hélène Chiapello, Claudine Médigue, Zoé Rouy, Corinne Teyssier, Stéphanie Vincent, Patrick Tailliez, Alain Givaudan, Sophie Gaudriault, « Attenuated Virulence and Genomic Reductive Evolution in the Entomopathogenic Bacterial Symbiont Species, *Xenorhabdus poinarii* ». *Genome Biology and Evolution* (2014) Vol. 6 1495-1513. First published online June 5, 2014. doi:10.1093/gbe/evu119.

Cet article présente l'étude génomique de la souche *Xp G6*. Nous y proposons un scénario de réduction génomique ayant mené à la non-virulence de cette souche par injection.

Attenuated Virulence and Genomic Reductive Evolution in the Entomopathogenic Bacterial Symbiont Species, *Xenorhabdus poinarii*

Jean-Claude Ogier^{1,2}, Sylvie Pagès^{1,2}, Gaëlle Bisch^{1,2}, Hélène Chiapello³, Claudine Médigue⁴, Zoé Rouy⁴, Corinne Teyssier⁵, Stéphanie Vincent⁴, Patrick Tailliez^{1,2}, Alain Givaudan^{1,2}, and Sophie Gaudriault^{1,2,*}

¹INRA, UMR Diversité, Génomes et Interactions Microorganismes-Insectes (DGIMI), Montpellier, France

²Université Montpellier 2, UMR Diversité, Génomes et Interactions Microorganismes-Insectes (DGIMI), France

³INRA Toulouse Midi-Pyrénées, Unité MIA-T, Chemin de Borde Rouge, Castanet-Tolosan, France

⁴CEA, Genoscope & CNRS, UMR 8030, Laboratoire d'Analyse Bioinformatique en Génomique et Métabolisme, Evry, France

⁵Université Montpellier 1, UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques/UMR95 Qualisud, CIRAD-Persyst, France

*Corresponding author: E-mail: sgaudriault@univ-montp2.fr.

Accepted: May 30, 2014

Data deposition: This project has been deposited at EBI-ENA under the accession numbers PRJEB4254 and PRJEB4255.

Abstract

Bacteria of the genus *Xenorhabdus* are symbionts of soil entomopathogenic nematodes of the genus *Steinernema*. This symbiotic association constitutes an insecticidal complex active against a wide range of insect pests. Unlike other *Xenorhabdus* species, *Xenorhabdus poinarii* is avirulent when injected into insects in the absence of its nematode host. We sequenced the genome of the *X. poinarii* strain G6 and the closely related but virulent *X. doucetiae* strain FRM16. G6 had a smaller genome (500–700 kb smaller) than virulent *Xenorhabdus* strains and lacked genes encoding potential virulence factors (hemolysins, type 5 secretion systems, enzymes involved in the synthesis of secondary metabolites, and toxin–antitoxin systems). The genomes of all the *X. poinarii* strains analyzed here had a similar small size. We did not observe the accumulation of pseudogenes, insertion sequences or decrease in coding density usually seen as a sign of genomic erosion driven by genetic drift in host-adapted bacteria. Instead, genome reduction of *X. poinarii* seems to have been mediated by the excision of genomic blocks from the flexible genome, as reported for the genomes of attenuated free pathogenic bacteria and some facultative mutualistic bacteria growing exclusively within hosts. This evolutionary pathway probably reflects the adaptation of *X. poinarii* to specific host.

Key words: entomopathogenic bacteria, Lepidoptera, *Steinernema*, comparative genomics, regions of genomic plasticity, genomic deletion.

Introduction

Symbioses between microorganisms and animals are widespread in numerous ecological niches. Mutualistic symbiosis is based on mutual exploitation, in which each organism contributes to the interaction but receives a net positive benefit. The benefits are diverse and include a mutual influence on nutrition, defense, reproduction, and development (Chaston and Goodrich-Blair 2010). Multipartite microbial symbiosis involves long-term associations between three or more species, with at least two of the partners benefiting from the

interaction (Hussa and Goodrich-Blair 2013). In the *Steinernema*–*Xenorhabdus* symbiotic interaction, soil entomopathogenic nematodes from the genus *Steinernema* are dependent on their intestinal bacterial symbiont, *Xenorhabdus* (*Enterobacteriaceae*), for colonization of the insects serving as their nutritional and reproductive niche. A nonfeeding soil-dwelling infective juvenile stage of the nematode penetrates the hemocel of the insect and releases the bacteria into the hemolymph. The bacterial symbiont helps to overcome insect immunity, kills the insect, and converts the

cadaver into an essential source of food for nematode growth and development. Nematodes undergo several rounds of reproduction within the insect cadaver. When nematode density becomes too high and the nutrients derived from the cadaver are exhausted, the bacteria recolonize the nematodes, which then emerge from the insect cadaver into the soil, to search for a new host (Goodrich-Blair and Clarke 2007; Richards and Goodrich-Blair 2009; Nielsen-LeRoux et al. 2012). No free-living forms of *Xenorhabdus* have ever been isolated outside of the nematode host (Forst et al. 1997). Except the direct vectorization in the insect hemolymph, the benefit of the association to the bacterium has yet to be elucidated.

Since the 1980s, various species of entomopathogenic nematodes have been sold and used as effective biological control agents for soil-inhabiting insects. Field and laboratory studies have demonstrated the importance of matching the appropriate nematode species with the particular pest targeted (Ehlers 2001). For example, the *Steinernema carpocapsae*–*Xenorhabdus nematophila* couple is virulent in various insect orders, and has been shown to be effective against *Pseudaletia unipuncta* (Lepidoptera), *Acheta domesticus* (Orthoptera), and *Plectrodera scalator* (Coleoptera). By contrast, the *St. glaseri*–*Xenorhabdus poinarii* couple is virulent principally in a few coleopteran species, such as *Popillia japonica* and *Cyclocephala hirta*, suggesting a potentially narrow host specificity (Wang et al. 1994; Converse and Grewal 1998; Rosa et al. 2002; Fallon et al. 2006).

Co-operation between the bacterial and the helminthic partner also differs between entomopathogenic couples. Under laboratory conditions, the bacterium or the nematode can be entomopathogenic alone. The injection of a dose of 100 cells of the bacteria *X. nematophila* and *X. bovienii* into larvae is lethal in diverse insects (Poinar and Thomas 1966; Forst et al. 1997; Ansari et al. 2003; Sugar et al. 2012). Aposymbiotic *St. carpocapsae* and *St. feltiae* nematodes lacking the *Xenorhabdus* symbiont can kill *Galleria mellonella* or *Tipula oleracea* although nematode reproduction is less efficient in the insect cadaver in the absence of the symbiont (Ehlers et al. 1997; Han and Ehlers 2000). These associations can, therefore, be considered as facultative for both partners under laboratory conditions. For example, a substantial body of molecular data has been accumulated on the factors enabling bacteria of species *X. nematophila* to adapt to the insect host in the absence of the nematode (Herbert et al. 2007; Nielsen-LeRoux et al. 2012). By contrast, co-operation is of much greater importance for the killing of insects in some bacterium-nematode complexes. In the *St. glaseri*–*X. poinarii* couple, the bacterial symbiont is avirulent or only weakly virulent when artificially injected into several insects (Akhurst 1986; Rosa et al. 2002; Ansari et al. 2003). No mortality is observed after the experimental infestation of *G. mellonella* with axenic *St. glaseri* nematodes (Akhurst 1986). However, a large proportion of *St. glaseri* nematodes are naturally aposymbiotic (Akhurst 1986). These contradictory features make it

difficult to evaluate the facultative status of the *St. glaseri*–*X. poinarii* association.

Host-adapted bacteria have been described in both mutualistic and pathogenic symbioses. Obligatory mutualistic symbionts of insects (e.g., *Buchnera*, *Wigglesworthia*, etc.) live in specialized host organs (bacteriomes) and share a long-standing coevolutionary history with their host. They are vertically transmitted and display extreme genomic reduction. Facultative mutualistic symbionts are not strictly necessary for their host. They do not live exclusively in a specialized organ and undergo horizontal transfers between host strains or species (Dale and Moran 2006). These symbionts may be found in an active free-living stage (e.g., the squid symbiont *Vibrio fischeri*) or may grow exclusively within the hosts (e.g., the insect symbiont *Wolbachia*). *Wolbachia*, like some host-adapted pathogenic bacterial species, such as *Burkholderia mallei* and *Mycobacterium leprae*, displays a massive expansion of insertion sequences (IS), leading to pseudogene formation, chromosomal rearrangements mediated by recombination between IS and moderate genome downsizing. These features are considered to constitute the initial stages of a drastic reduction of genome size (Moran and Plague 2004; Gomez-Valero et al. 2007; Song et al. 2010). Finally, some host-adapted pathogenic bacteria, such as *My. tuberculosis* and the asymptomatic bacteriuria (ABU) strains of *Escherichia coli*, display moderate genome downsizing without massive IS expansion (Zdziarski et al. 2008; Veyrier et al. 2011). In such cases, the decrease in genome size probably results from the excision of mobile genetic elements.

We focused here on the pathogenic and genomic properties of the very poorly documented species *X. poinarii*. We compared the virulence of five *X. poinarii* strains by injecting them into the lepidopteran *Spodoptera littoralis*. We confirmed that all five strains tested had attenuated virulence. We sequenced the genomes of the *X. poinarii* G6 strain (Xp_G6) and the *X. doucetiae* FRM16 (Xd) strain, a closely related virulent strain. We showed that the genome of Xp_G6 was much smaller (500–700 kb) than those of Xd, *X. nematophila* ATCC19061 (Xn) and *X. bovienii* SS-2004 (Xb), which have recently been sequenced and analyzed (Ogier et al. 2010; Chaston et al. 2011). This small genomic size is a key feature of the *X. poinarii* species resulting from reductive evolution, probably mediated by the deletion of regions of genomic plasticity (RGP). Thus, our study made it possible to compare the evolutionary history of the *X. poinarii* genome with that of other *Xenorhabdus* species.

Materials and Methods

Bacterial Strains, Media, Phenotypic Analyses, and Genomic DNA Extraction

All the bacterial strains used in this study are listed in table 1. *Xenorhabdus* strains were routinely grown in Luria–Bertani

(LB) broth, 1.5% nutrient agar medium (GNO) or NBTA medium (GNO supplemented with 25 mg bromothymol blue and 40 mg triphenyl-2,3,4 tetrazolium chloride per liter) at 28 °C. Bacteria were stored at –80 °C in 16% glycerol (v/v). Genomic DNA was extracted as previously described (Gaudriault et al. 2006) and stored at 4 °C.

Phylogenetic Analysis

Sequence alignment was generated and phylogenetic methods were performed as previously described (Tailliez et al. 2010, 2012). Briefly, for each bacterial strain, individual gene fragments (*recA*, 646 nucleotides; *gyrB*, 864 nucleotides; *dnaN*, 828 nucleotides; *gltX*, 913 nucleotides; and *infB*, 965 nucleotides) were aligned using MUSCLE (Edgar 2004) and then concatenated with the seaview platform (<http://doua.prabi.fr/software/seaview>, last accessed June 17, 2014). Ambiguously aligned blocks were removed by the Gblocks method (Castresana 2000) or the “Guidance” program (Penn et al. 2010). Maximum-likelihood analysis (phyML 3.0) was carried out with the general time-reversible model of substitution with gamma-distributed rate heterogeneity and a proportion of invariant sites determined for all five protein-coding sequences by jModelTest, to give the best fit to the data according the Akaike information criterion (Posada and Crandall 1998). MUSCLE, Gblocks, PhyML, and bootstrap values were obtained from the phylogeny.fr platform (Dereeper et al. 2008). Five *X. poinarii* strains, 23 type strains representative of *Xenorhabdus* species and the *Xb* strain, the genome of which has been sequenced, were included in this study. Three strains of *Photorhabdus* and one strain of *Proteus mirabilis* were used as closely related outgroups. The accession numbers of the individual genes used for building phylogenetic trees are listed in [supplementary table S1, Supplementary Material](#) online. The Enterobacteriaceae phylogenetic tree was constructed as described above, from the concatenated sequences of 12 conserved individual genes from the core genome (*infB*, *nusA*, *polA*, *pyrD*, *rpoB*, *valS*, *cysS*, *metK*, *purA*, *tpiA*, *smgB*, *secY*) of 47 Enterobacteriaceae strains. These genes belong to the defined set of 205 single-copy genes resistant to horizontal genetic

transfer (HGT) and providing a reliable and consistent reconstruction of the phylogeny of γ -Proteobacteria (Lerat et al. 2003). These 12 genes were chosen for study on the basis of their homogeneous distribution along the length of the chromosome, and their similar model of DNA sequence evolution, as assessed with jModeltest (Posada and Crandall 1998). The nucleotide sequences used to construct the phylogenetic trees for Enterobacteriaceae and *xaxA* were extracted from publicly available genomes.

Insect Pathogenicity Assays

Bacteria were directly injected into two model insects: *Sp. littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) corn variant from Spain and *G. mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae), as previously described (Sicard et al. 2004). For *Sp. littoralis*, all injections were performed on 1-day-old sixth-instar larvae that had been reared on an artificial diet (Poitout 1970) at 23 ± 1 °C, with a photoperiod of L16:D8 and a relative humidity of $40 \pm 5\%$. For *G. mellonella*, all injections were performed on last-instar larvae reared at 28 °C in the dark with honey and pollen. *Xenorhabdus* strains were grown in LB broth (Difco) at 28 °C, with shaking, to exponential growth phase, corresponding to an optical density of 0.8 at 600 nm (Jenway Colorimeter). We injected 20 μ l of bacterial suspension, containing 500–1,000 cells, into 20 larvae, with a Hamilton syringe. The surface of the insect larva was sterilized with 70% (v/v) ethanol before the injection of the bacteria into the hemocoel. The number of bacteria injected into the larvae was checked by plating serial dilutions on LB agar plates. Insect mortality was assessed at regular point times after injection, for the evaluation of LT₅₀. At least four independent experiments were performed for each strain. For *Sp. littoralis* assays, statistical analysis was carried out with the Statistical Package for Social Science version 11.0.1 (SPSS, Chicago, IL), comparing individual survival times within each group.

Sequencing and Assembly of the Whole Genomes

The complete genome sequences of *Xp_G6* and *Xd* were obtained by a mixture of Sanger capillary and new sequencing technologies. We first added about 23-fold coverage of 454

Table 1

List of *Xenorhabdus* Strains Used in This Study

Strain	Species	Nematode Host from Which Strain Was Isolated	Geographical Origin	Reference
G6 (ATCC 49121)	<i>X. poinarii</i>	<i>Steinernema glaseri</i>	USA (NC)	Akhurst 1986
AZ26	<i>X. poinarii</i>	<i>St. glaseri</i>	Portugal	Rosa et al. 2002
NC33	<i>X. poinarii</i>	<i>St. glaseri</i>	USA (NC)	Fischer-Le Saux, Arteaga-Hernandez, et al. 1999
SK72	<i>X. poinarii</i>	<i>St. glaseri</i>	USA (FL)	Fischer-Le Saux, Arteaga-Hernandez, et al. 1999
CU01	<i>X. poinarii</i>	<i>St. cubanum</i>	Cuba	Fischer-Le Saux, Arteaga-Hernandez, et al. 1999
ATCC19061	<i>X. nematophila</i>	<i>St. carpocapsae</i>	USA	Chaston et al. 2011
SS2004	<i>X. bovienii</i>	<i>St. jolietti</i>	USA (MO)	Chaston et al. 2011
FRM16	<i>X. doucetiae</i>	<i>St. diaprepesi</i>	Martinique	Fischer-Le Saux, Arteaga-Hernandez, et al. 1999

GSflx (Roche; www.roche.com, last accessed June 17, 2014) reads to Sanger reads, derived from a library with an insert fragment size of 10 kb. This library was constructed by the mechanical shearing of genomic DNA and insertion of the fragments generated into pCNS (pSU18-derived). Plasmid DNA was then purified and end-sequenced (5,745 reads for *Xp_G6* and 5,877 reads for *Xd*) by dye-terminator techniques, with ABI3730 sequencers (Applied Biosystems, Foster City, CA), resulting in approximately 1-fold coverage for both genomes. After assembly with Arachne (www.broadinstitute.org, last accessed June 17, 2014), to decrease the number of scaffolds, 5.6-fold coverage mate-paired 454 GSflx reads (with a library insert size of about 3 kb) were then added. The whole reads were assembled with Newbler (Roche) and validated via the Consed interface (www.phrap.org, last accessed June 17, 2014). For the finishing phase, we used primer walking on clones, polymerase chain reaction (PCR) and in vitro transposition technology (Template Generation System II Kit; Finnzyme, Espoo, Finland), generating 359, 162 and 533 additional reads, respectively, for *Xp_G6* and 701, 823 and 3,701 additional reads, respectively, for *Xd*. Illumina reads (36 bp) corresponding to a coverage of about 50-fold were mapped with SOAP (<http://soap.genomics.org.cn>, last accessed June 17, 2014) during the polishing phase, as previously described (Aury et al. 2008).

PCR Amplification and the Sequencing of Nucleotidic Fragments

PCR amplifications targeting selected genomic regions were carried out, for analysis of the distributions of these regions in a panel of *Xenorhabdus* strains. Consensual pairs of primers (supplementary table S2, Supplementary Material online) were manually designed from clustalW alignments (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>, last accessed June 17, 2014) of selected regions of *Xenorhabdus* reference genomes. Fragments with a predicted size of less than or greater than 3 kb were amplified with *Taq* polymerase (Invitrogen) or with the High Proof DNA Polymerase (BioRad), respectively, according to the manufacturer's protocol. PCR amplifications were performed with a BioRad thermocycler (BioRad), and PCR products were analyzed by electrophoresis in an agarose gel. Amplicons were sequenced by MWG-Eurofins France.

Pulsed-Field Gel Electrophoresis Analysis

Intact genomic DNA was extracted in agarose plugs as follows. Bacterial cells grown on nutrient agar plates were suspended in phosphate-buffered saline (GIBCO; Invitrogen) to a turbidity of 1.25 at 650 nm, included in 1.2% low-melting point agarose (SeaPlaque[®]GTG) solution (v/v) and lysed, as previously described (Jumas-Bilak et al. 1998). I-Ceul (New England Biolabs) hydrolysis was performed as previously described (Teyssier et al. 2005). Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) was performed in a 0.8% agarose gel, in 0.5× Tris–

borate–ethylenediaminetetraacetic acid buffer, at 4.5 V/cm and 10 °C, in a CHEF-DRII apparatus (BioRad). The separation of I-Ceul fragments was optimized by using different electrophoresis conditions for fragments of different sizes: 1) a pulse ramp from 5 to 35 s for 24 h for fragments of less than 500 kb in size and 2) a pulse ramp from 150 to 400 s for 45 h for I-Ceul fragments between 500 and 4,000 kb in size. The molecular markers used were the chromosomes of *Saccharomyces cerevisiae* and *Hansenula wingei* (BioRad).

Genomic Analyses

Genome Annotation

Functional annotation was carried out with the tools of the MicroScope platform (Vallenet et al. 2013) and the annotated genome was implemented in the public XenorhabduScope database (<https://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope/home/index.php>, last accessed June 17, 2014). We used specific tools for the annotation of specific gene families. The nonribosomal peptide synthetase (NRPS) and polyketide synthase (PKS) genes were predicted by the “2metDB” method (Bachmann and Ravel 2009) implemented at the MicroScope platform. Toxin–antitoxin (TA) systems were predicted with RASTA-Bacteria software (Sevin and Barloy-Hubler 2007) and we focused on predicted proteins with a domain characteristic of one of the nine most frequent TA system families: CcdA/CcdB, HicA/HicB, HigB/HigA, HipA/HipB, MazE/MazF, ParD/ParE, Phd/Doc, RelB/RelE, and VapB/VapC (Pandey and Gerdes 2005). We used the ISSaga platform (<http://www-is.biotoul.fr/>, last accessed June 17, 2014) to count IS (Varani et al. 2011).

Synteny Analysis

Whole-genome alignments were performed with the “Synteny Line Plot” tool available from the MaGe Platform (<http://www.genoscope.cns.fr/agc/mage>, last accessed June 17, 2014), which carries out a global comparison of two bacterial genomes on the basis of synteny results. The percentage of coding sequences (CDS) displaying synteny between the four genomes was calculated with the synteny statistic tool available from the MaGe Platform. The minimum size of the synteny groups was five genes.

Core and Flexible Genome Analysis

We used the SiLiX program of the MicroScope platform to cluster proteins into families of homologous sequences (MICFAM) (Miele et al. 2011). This program computes pan, core, and flexible genomes.

Analysis of Mobile Genetic Elements

RGP were sought in the four *Xenorhabdus* genomes (except for the plasmid of *Xn*). First, Prophinder was first used to detect prophages in the four *Xenorhabdus* genomes (Lima-

Mendez et al. 2008) (<http://aclame.ulb.ac.be/Tools/Prophinder/>, last accessed June 17, 2014). We then used the RGPFinder web tool implemented via the MaGe annotation platform (<http://www.genoscope.cns.fr/agc/mage>, last accessed June 17, 2014) to identify GI (genomic islands) and RGP_{sensu stricto} (see Ogier et al. [2010] for detailed procedure). Briefly, RGPFinder searches for genomic regions (minimal size of 5 kb) displaying breaks in synteny between a query genome and a set of closely related genomes. If the regions displayed characteristics typical of foreign DNA acquired by HGT, such as compositional bias (GC% deviation, codon adaptation index) or tRNA, IS, integrase genes and genetic elements involved in DNA mobility, they were classified as GI. Regions without such features were classified as RGP_{sensu stricto}. For the identification of integrative and conjugative elements (ICEs) in the *Xenorhabdus* genomes, we searched for genes encoding conjugation machinery, which consists of a relaxase, a T4SS and a type 4 coupling protein (Guglielmini et al. 2011). The ICE core was completed by searches for genes involved in 1) ICE replication, 2) DNA integration/excision, and 3) pilus biosynthesis (Seth-Smith et al. 2012).

Comparison of Gene Content

We used the MicroScope Gene Phyloprofile tool to identify sets of genes specific to *Xenorhabdus* genomes, with the following homology constraints: bidirectional best hit, minimal alignment coverage of 0.8, and amino acid sequence identity of 30%.

Gene Remnant Identification

We analyzed gene remnants in the *Xp_G6* genome by first extracting protein sequences from the *Xd* genome present in the other two virulent strains, *Xn* and *Xb*, but absent from *Xp_G6* using results of the Gene Phyloprofile tool from the MicroScope platform and a custom-designed Perl Script. We then compared each of these proteins with the six-frame translations of the complete genome of *Xp_G6*, using the TBLASTN software, a sensitive method of searching for traces of partial coding regions not annotated in the *Xp_G6* genome. A gene was considered to be remnant in the *Xp_G6* genome if the corresponding TBLASTN results met the following criteria: HSP (high-scoring segment pair), including one to three different hits displaying at least 40% identity and with an *e* value <0.01.

Results

Phylogenetic Features of the Species *X. poinarii*

Strains AZ26, CU01, G6, NC33, and SK72 were previously classified within the species *X. poinarii* (Fischer-Le Saux, Viallard, et al. 1999; Tailliez et al. 2006) (table 1). We determined the phylogenetic position of the five strains within the genus *Xenorhabdus* with five concatenated protein-coding

sequences: *recA*, *gyrB*, *dnaN*, *gltX*, and *infB* (fig. 1). The five strains clustered together on a clearly separate subbranch of clade C₁ (Tailliez et al. 2010, 2012). Therefore, the species *X. poinarii* emerged from the clade C₁ ancestor. The CU01 strain, which was located in a slightly different position, could be seen as lying at the edge of the species *X. poinarii*, as previously suggested by other authors (Fischer-Le Saux, Arteaga-Hernandez, et al. 1999; Tailliez et al. 2006).

Pathology of the Species *X. poinarii*

The species *X. poinarii* has been described as weakly virulent following its direct injection into insect hemolymph (Akhurst 1986; Converse and Grewal 1998; Rosa et al. 2002; Ansari et al. 2003). We investigated the virulence of *X. poinarii* strains AZ26 (*Xp_AZ26*), CU01 (*Xp_CU01*), *Xp_G6*, NC33 (*Xp_NC33*) and SK72 (*Xp_SK72*) in insect larvae, by injecting 1,000 bacterial cells/larva directly into the hemocoel of *Sp. littoralis* and *G. mellonella*, these two insects being highly resistant and susceptible, respectively, to pathogenic bacteria. As a control, we used the strains *Xn* and *Xb*, two virulent *Xenorhabdus* reference strains, the genomes of which have been sequenced (Chaston et al. 2011). The two reference strains rapidly killed *Sp. littoralis* larvae, with an LT₅₀ of 24–26 h, whereas the *X. poinarii* strains were strictly nonpathogenic (*P* < 0.05; table 2). By contrast, in *G. mellonella*, three *X. poinarii* strains (*Xp_G6*, *Xp_SK72*, and *Xp_CU01*) were found to be as virulent as the reference strains *Xn* and *Xb* (LT₅₀ < 21 h). *Xp_NC33* was slightly attenuated (LT₅₀ = 35 h) and *Xp_AZ26* was strictly nonpathogenic (table 2). We checked that weak virulence was not a feature common to the strains of phylogenetic clade C₁, by also investigating the virulence of a type strain of this clade, *Xd*. This strain was as virulent as the reference strains, *Xn* and *Xb* in both insects (*P* < 0.05; table 2). In conclusion, the avirulence of the *X. poinarii* species in the highly resistant insect, *Sp. littoralis*, is a feature specific to this species.

Sequencing of the *Xp_G6* and *Xd* Genome Sequences

We investigated the genomic content of *X. poinarii* by sequencing the genome of *Xp_G6*, the type strain of the species isolated from the nematode *St. glaseri* G6 in North Carolina (Akhurst 1982, 1983; Akhurst and Boemare 1988). We also sequenced the genome of *Xd*, for a comparison of the genome of *Xp_G6* with a closely related pathogenic *Xenorhabdus* strain.

General Genome Features

The genomes of *Xp_G6* and *Xd* consist of circular chromosomes of 3,659,523 and 4,195,202 bp, encoding 3,715 and 3,974 proteins, respectively. In addition, *Xd* also harbors an 8,449-bp plasmid containing 12 protein-coding sequences displaying little similarity to the other CDS described, except for a putative sugar fermentation stimulation protein B (Ner-like protein) and a putative ParDE TA system (supplementary

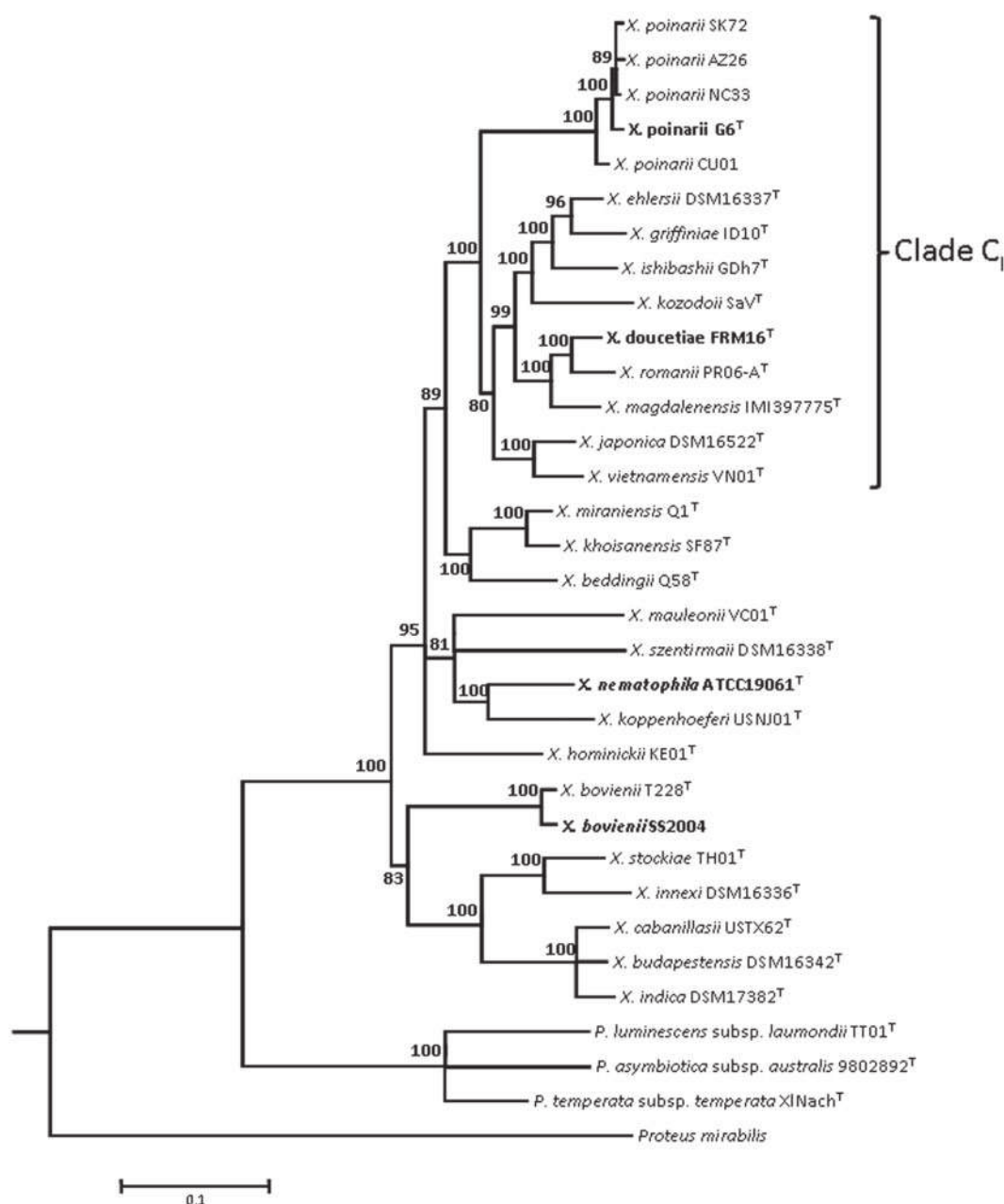


FIG. 1.—Maximum-likelihood phylogenetic tree showing the positions of *Xenorhabdus poinarii* strains within the genus *Xenorhabdus*. The analysis is based on five concatenated protein-coding sequences (*recA*, *gyrB*, *dnaN*, *gltX*, and *infB*). It was carried out with the GTR model of substitution, with a gamma-distributed rate heterogeneity and a proportion of invariant sites. *Photorhabdus* and *Proteus* sequences were used as outgroups. Bootstrap values (Felsenstein 1988) of more than 80% (from 100 replicates) are indicated at the nodes. Clade C₁, which includes all the *X. poinarii* strains, is as previously described (Tailliez et al. 2010). The names of strains for which genomes have previously been sequenced or were sequenced in this study are indicated in bold italic and bold normal typescript, respectively. Bar: 10% divergence.

table S3, Supplementary Material online). The *Xp_G6* chromosome is clearly smaller (from 536 to 773 kb smaller) than the chromosome of the three virulent strains *Xn*, *Xb*, and *Xd* (table 3). The *Xp_G6* chromosome harbors fewer pseudogenes than the chromosomes of *Xn*, *Xb* and *Xd*, and this difference was particularly marked for the comparison with

the 4.4 Mb chromosome of *Xn*, which is particularly rich in pseudogenes. It also has fewer repeated regions that usually serve as a substrate for chromosomal deletions and rearrangements (Treangen et al. 2009) than the chromosome of *Xn*, *Xb*, and *Xd*. The four strains have similar coding sequence densities (from 80% to 86%). *Xp_G6* and *Xd* contain 156 and 192

putative IS, respectively, a much smaller number than for *Xn* and *Xb* (436 and 369, respectively).

Xenorhabdus Pan Genome, Core Genome, and Flexible Genome

We analyzed the pan, core, and flexible genomes of the four *Xenorhabdus* genomes (fig. 2). The *Xenorhabdus* pan genome, corresponding to the total number of gene families present in *Xenorhabdus*, consists of 7,250 gene families. The *Xenorhabdus* core genome (Xcg), corresponding to the set of gene families common to the four *Xenorhabdus* strains, consisted of 1,904 gene families, or 40–50% of all the gene families present in each *Xenorhabdus* strains. We then introduced *Es. coli* strain K12, a commensal Enterobacteriaceae strain,

into the analysis, which made it possible to identify an Enterobacteriaceae core genome (Ecg) of 1,547 gene families. The subtraction of the Ecg from the Xcg left us with 357 gene families that we considered to constitute the specific Xcg (see list in [supplementary table S4, Supplementary Material](#) online). The specific Xcg probably includes genes encoding factors essential for the *Xenorhabdus* lifestyle, particularly for symbiosis with the *Steinernema* and pathogenicity in insects. It encompasses many gene families previously described as encoding putative effectors of host interactions in the highly studied species *X. nematophila*: 1) factors potentially involved in hemocyte toxicity, such as the Xh1A hemolysin, the RtxA toxin, the pore-forming fimbrial subunit MrxA, and enzymes involved in the synthesis of the lipopolysaccharide endotoxin; 2) enzymes required for the biosynthesis of rhabduscin, which inhibits phenoloxidase activity, an innate immune defense strategy of insects; 3) PrtS, PrtA, XlpA, EstA, PulA, extracellular enzymes probably involved in cadaver degradation; and 4) xenorhabduscin, a phage tail-like bacteriocin involved in intra-species and interspecies competition within the nematode partner (Herbert et al. 2007; Chaston et al. 2011; Crawford et al. 2012). Interestingly, in addition to many genes encoding proteins of unknown functions, the specific Xcg also contains genes potentially involved in iron metabolism and transport, sodium transport, histidine and thiamine metabolism, and resistance to tellurium.

The flexible genome (corresponding to the subtraction of the Xcg from the pan genome) consists of gene families absent from at least one of the genomes compared. The flexible genome of each strain accounts for 42%, 44%, 53% and 49% of the total numbers of gene families in the *Xp_G6*, *Xd*, *Xn* and *Xb* genomes, respectively. The flexible genome is rich in strain-specific gene families (23–36%) mostly annotated as conserved genes of unknown function, orphan genes or

Table 2

Pathogenicity of Eight Bacterial Strains Tested by Intrahemocoelic Injection into Last Instar-Larvae of *Spodoptera littoralis* (incubated at 23°C) and *Galleria mellonella* (incubated at 28°C)

Species	Strain	LT50 (h) ^a	
		<i>Sp. littoralis</i> ^b	<i>G. mellonella</i>
<i>Xenorhabdus poinarii</i>	G6	No mortality	<21
<i>X. poinarii</i>	AZ26	No mortality	No mortality
<i>X. poinarii</i>	NC33	No mortality	35
<i>X. poinarii</i>	SK72	No mortality	<21
<i>X. poinarii</i>	CU01	No mortality	<21
<i>X. nematophila</i>	ATCC19061	24	<21
<i>X. bovienii</i>	SS-2004	25–26	<21
<i>X. doucetiae</i>	FRM16	26–27	<21

^aMortality was recorded over 48 h; intrahemocoel injection of 1,000 bacterial cells/larva.

^bStatistical analysis was carried out for each strain on at least four independent experiments ($P < 0.05$).

Table 3

Comparison of the Genomic Features in *Xenorhabdus nematophila* ATCC19061, *X. bovienii* SS-2004, *X. doucetiae* FRM16, and *X. poinarii* G6

Feature	<i>X. nematophila</i> ATCC19061		<i>X. bovienii</i> SS-2004	<i>X. doucetiae</i> FRM16		<i>X. poinarii</i> G6
	Chromosome	Plasmid		Chromosome	Plasmid	
Size (bp)	4,432,590	155,327	4,225,498	4,195,202	8,449	3,659,522
G+C content (%)	44.19	45.97	44.97	45.71	45.09	44.55
CDS	4,299	175	4,260	3,974	12	3,715
Coding density (%)	80.52	79.62	85.64	85.93	50.21%	84.67
Mean CDS (bp)	860	711	850	933	464	856
Mean intergenic length (bp)	163	150	158	155	495	164
Repeated regions (%)	16.58%	17.99%	16.27%	16.18%	0	9.21%
Pseudogenes	99	4	58	45	0	38
IS	436	ND	369	192	ND	156
Phage genes	275 (6)	ND	437 (8)	157 (7)	0	377 (7)
rRNA operons	7	0	7	7	0	7
tRNAs	79	0	83	76	0	77
Accession number	FN667742	FN667743	FN667741	FO704550	FO704549	FO704551

NOTE.—ND, not determined.

genes associated with mobile and extrachromosomal elements, suggestive of probable acquisition by horizontal gene transfer.

Regions of Genomic Plasticity

For the visualization of strain-specific regions, we generated a whole-genome alignment of the sequences of *Xp_G6* and *Xd* (fig. 3A). Despite belonging to closely related species, *Xp_G6* and *Xd* displayed numerous shuffled regions, with synteny conservation for only 65% of the CDS. The large-scale genome rearrangements revealed by synteny comparison were not correlated with differences in genome sizes: whole-genome alignments of *Xp_G6* and *Xd* with *Xb* and *Xn* (fig. 3B and C) displayed similar rearrangement patterns and similar percentages of CDS in synteny (64–67%). Genome rearrangements are, therefore, widespread within the genus *Xenorhabdus*, as previously described for *Xb* and *Xn* (Ogier et al. 2010).

The large-scale genome rearrangements revealed by genome synteny comparison may result from recombination events (horizontal gene transfer, duplications, inversions, deletions) in the flexible genome. The flexible genome is often structured into RGP, which contain mobile genetic elements, such as genomic islands (GI) and prophage loci, and hypervariable segments, hereafter referred as RGP_{sensu stricto} (Ogier et al. 2010). We identified the RGP of the *Xb* and *Xn* genomes by comparing these genomes with a set of Enterobacteriaceae genomes, using the RGPfinder tool (Ogier et al. 2010). In this study, we carried out a new analysis with the four *Xenorhabdus* genomes as the set of genomes for comparison, leading to the identification of 57, 67, 73 and 79 RGP in the *Xp_G6*, *Xd*, *Xb* and *Xn* genomes, respectively. *Xp_G6* had the smallest number of RGP, accounting for 34% of the entire genome, versus 40–43% for the other three *Xenorhabdus*

genomes considered (table 4 and supplementary table S5, Supplementary Material online). No integral RGP was conserved in all four genomes and, as previously described, only subregions of RGP, named modules, were conserved. This suggests that modules are the true units of plasticity in *Xenorhabdus* genomes (Ogier et al. 2010).

We searched for ICEs among the RGP. By contrast to what has been shown for the closely related strain *Photorhabdus luminescens* TT01, but similarly with the ICEHln1056 of *Haemophilus influenza* strain 1056, the potential *Xenorhabdus* ICEs consisted of only a remnant of the pilus synthesis locus, an entire or partial *pilL* gene (supplementary table S6, Supplementary Material online). This part is not essential for ICE self-mobilization (Seth-Smith et al. 2012). Thus, each of the four strains has one entire chromosomal ICE without a pilus synthesis locus and one partial chromosomal ICE, lacking the other features of canonical ICEs. Moreover, *Xn* harbors an entire ICE with no pilus synthesis locus on its megaplasmid and a partial copy of it on the chromosome. This last feature probably results from integration of the *Xn* plasmid into the chromosome, followed by gene loss and plasmid immobilization. In addition to ICEs, we also classified RGP into GI, prophages, or RGP_{sensu stricto}. We found similar numbers of GI in *Xp_G6*, *Xd*, *Xb*, and *Xn* (25, 27, 24, and 30, respectively; table 4). GI were generally located within conserved integration hot spots throughout the genome (supplementary table S5, Supplementary Material online), but gene content was rarely conserved within the GI. The ProPhinder tool allowed us to classify some RGP as prophages (Lima-Mendez et al. 2008; Ogier et al. 2010) (table 4). The four genomes were found to harbor similar numbers of prophage regions. Two P2-related phage clusters have already been described in *Xb* (*xbp1* and *xbp2*) and *Xn* (*xnp1* and *xnp2*), and *xbp1* and *xnp1* have been shown to encode the components of a phage tail-like bacteriocin (Morales-Soto et al. 2012).

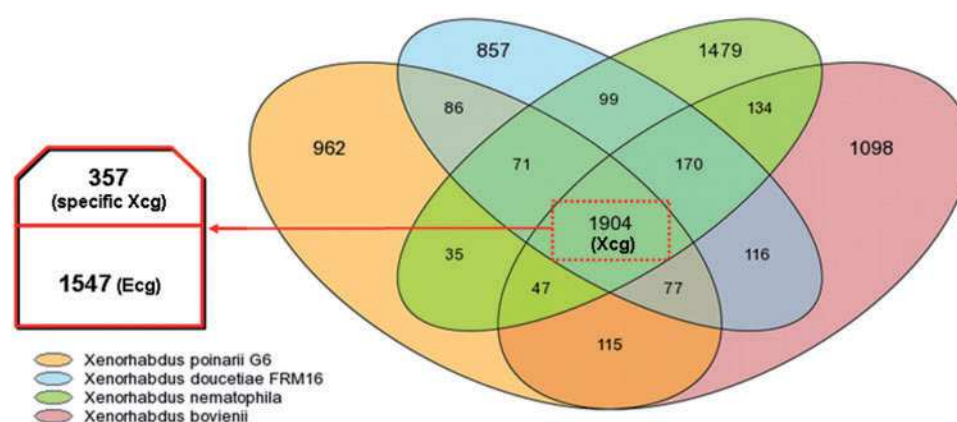


Fig. 2.—Venn diagram showing numbers of orthologous genes in the genomes of *Xenorhabdus nematophila* ATCC19061, *X. bovienii* SS-2004, *X. doucetiae* FRM16 and *X. poinarii* G6. The Xcg (1,904 gene families) is framed by red dashes, and includes the Ecg (1,547 gene families common to *Escherichia coli* K12) and the specific Xcg (357 gene families).

Likewise, we described *xdp1* and *xdp2* in *Xd* and *xpp1* in *Xp_G6* (supplementary table S5, Supplementary Material online). Finally, RGP_{sensu stricto}, which did not display features of foreign DNA acquired by HGT, accounted for only 9% of the entire *Xp_G6* genome, whereas they accounted for 14–19% of the other three genomes (table 4).

Genomic Content of *Xp_G6* and *Xd* and Comparative Analysis with *Xb* and *Xn* Genomes

We screened the content of the *Xp_G6* and *Xd* genomes and compared it with that of the *Xb* and *Xn* genomes by two approaches. We first searched for genes or loci potentially involved interactions with the host and/or environment on the basis of their annotation. We then systematically searched for genes specifically absent from *Xp_G6* and present in the other genomes (supplementary table S7, Supplementary Material online). The genomic regions or genes with a remarkable distribution in the four genomes are listed in table 5.

Secretion Systems

We explored the secretion potential of the four *Xenorhabdus* strains. The four genomes have nearly similar numbers of T1SS (21, 23, 20 and 18 for *Xn*, *Xb*, *Xd* and *Xp_G6*, respectively). As previously reported (Chaston et al. 2011), they possess genes encoding the Sec pathway, but they do not encode a T2SS to mediate the crossing of the outer membrane. Unlike the

genomes of genus *Photorhabdus*, *Xenorhabdus* genomes have no genes encoding a T3SS, confirming the divergence between *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* in terms of lifestyle (Chaston et al. 2011). We identified two T4SS loci in the *Xb*, *Xd* and *Xp_G6* genomes and four T4SS loci in the *Xn* genome, components of entire or partial ICEs (see above). Two T6SS loci were present in the *Xn*, *Xb* and *Xp_G6* genomes, and *Xd* was found to carry one additional copy. Finally, the distribution of loci for the T5SSs was particularly marked. The T5SS consists of a transported protein, TpsA, and a channel-forming protein, TpsB, the sole accessory protein devoted to the secretion of TpsA. All four genomes were found to contain a locus encoding XhIA–XhIB, which has been shown to be involved in the export of the XhIA hemolysin responsible for insect virulence in *Xn* (Cowles and Goodrich-Blair 2005). Only the *Xp_G6* genome lacked all the other T5SS systems (table 5).

Insecticidal Toxins, Cytotoxins, and Hemolysins

Xenorhabdus produces an array of insecticidal toxins (Hinchliffe et al. 2010). PirAB (Duchaud et al. 2003; Waterfield et al. 2005) is encoded by the *Xn*, *Xd* and *Xp_G6* genomes, whereas the Tpx40 toxin (Brown et al. 2006) is encoded by only the *Xn* genome. None of the *Xenorhabdus* strains encoded the Mcf1 toxin potentially responsible for triggering apoptosis in insect cells via a BH3-like N-terminal domain (Daborn et al. 2002; Dowling et al. 2007), but the

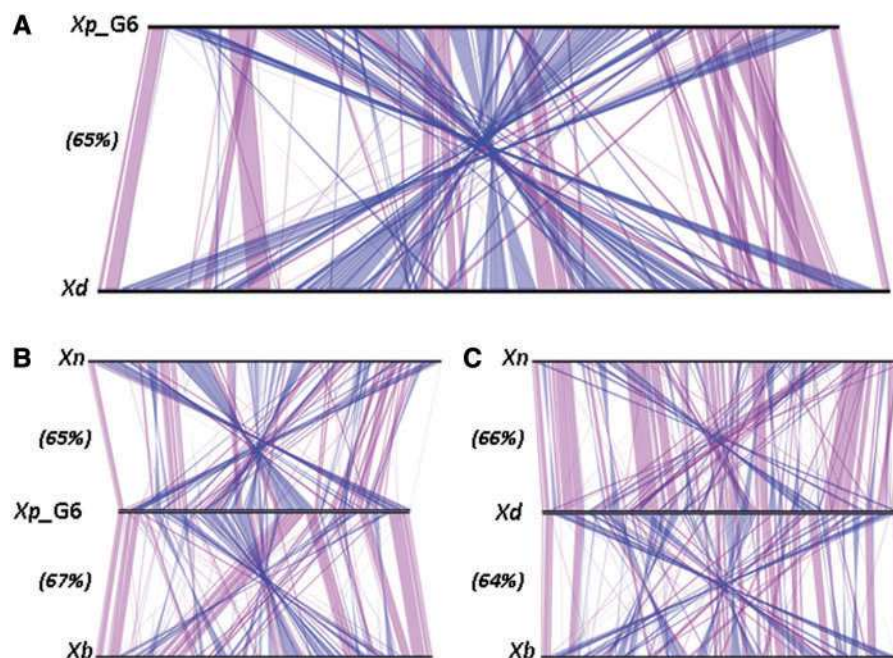


FIG. 3.—Whole-genome sequence alignments between *Xenorhabdus* genomes. The line plots were obtained with the results for synteny between (A) *X. poinarii* G6 (*Xp_G6*) and *X. doucetiae* FRM16 (*Xd*); (B) *Xp_G6*, *Xn*, and *Xb*; (C) *Xd*, *Xn*, and *Xb*. Matches between synteny groups occurring on the same strand are shown in purple; matches between synteny groups occurring on the opposite strand are shown in blue. Numbers in brackets indicate the percent of CDS in synteny for each whole-genome alignment.

Table 4

Number and Classification of RGP in the *Xenorhabdus nematophila* ATCC19061, *X. bovienii* SS-2004, *X. doucetiae* FRM16, and *X. poinarii* G6 Genomes as a Function of Their Genetic Composition (numbers in brackets indicate the percentage of total genome size)

	Number of Prophages (%)	GI (%)	RGP ^{sensu stricto} (%) ^a
<i>X. poinarii</i> G6	7 (7.3)	25 (16.4)	25 (8.8)
<i>X. doucetiae</i> FRM16	7 (3.7)	27 (19)	33 (19.3)
<i>X. bovienii</i> SS-2004	8 (7.1)	24 (16)	41 (14.3)
<i>X. nematophila</i> ATCC19061	6 (6.2)	30 (21.5)	43 (15.6)

^aRGP that are not prophages or GI.

Xp_G6 was the only strain with no Mcf ortholog, Mcf2 or Mcf-like sequence (Waterfield et al. 2003). Interestingly, neither *Xd* nor *Xp_G6* was found to possess loci encoding proteins of the toxin complex (Tc) family (Waterfield et al. 2001). These high-molecular weight proteins have two effects: 1) an oral effect, due to the targeting and disruption of the intestinal epithelium of the lepidopteran *Manduca sexta* (Bowen et al. 1998) and 2) a phagocytosis-inhibiting effect on insect cells due to the modification of actin and Rho GTPases through ADP-ribosyltransferase activity (Lang et al. 2010; Lango and Clarke 2010). The *tc* genes are located in GI that were probably acquired by HGT (Waterfield et al. 2002; Ogier et al. 2010). The absence of *tc* loci from the genomes of *Xd* and *Xp_G6*, both of which belong to phylogenetic clade C₁ (fig. 1), strongly suggests either gene loss or an absence of HGT for *tc* loci in the bacterial ancestor of phylogenetic clade C₁. Interestingly, each *Xenorhabdus* strain possesses a different cocktail of insecticidal toxins, correlated with phylogenetic status rather than with virulence status. Moreover, the paucity of insecticidal genes in phylogenetic cluster I, which contains both virulent and avirulent strains, argues against a major role for insecticidal toxins in the virulence process.

Xenorhabdus also counteracts cellular immunity by producing cytotoxins and hemolysins (Nielsen-LeRoux et al. 2012). The *xaxAB* locus of the *X. nematophila* F1 strain, which encodes a binary pore-forming cytotoxin with apoptotic and necrotic activities in mammalian and insect cells (Vigneux et al. 2007), was absent only from the *Xp_G6* genome (table 5). The XaxA and XaxB proteins are probably required for tissue degradation in the cadaver and for efficient subsequent nematode reproduction (Jubelin et al. 2011).

NRPS and PKS

Xenorhabdus protects the insect cadaver from other organisms that might seek to use it as food, by synthesizing an array of secondary metabolites, including antibacterial molecules synthesized by large, multimodular enzymes: the NRPS and PKS (Bode 2009). By searching for NRPS and PKS domains, we identified 16, 13, 12 and 10 loci potentially encoding NRPS/PKS enzymes in the genomes of *Xn*, *Xb*, *Xd* and *Xp_G6*, respectively. Nevertheless, these similarities in the number of loci

conceal considerable differences between the four genomes. Indeed, the number of NRPS/PKS modules, the functional units of the multimodular NRPS–PKS enzymes, was found to be significantly smaller in the *Xp_G6* genome (21 modules, 106 kb) than in the *Xb*, *Xd* and *Xn* genomes (56–79 modules, 253–413 kb). Furthermore, the *pax* locus, encoding NRPS enzymes involved in the synthesis of PAX peptides, which are lysine-rich antifungal cyclolipopeptides (Gualtieri et al. 2009; Fuchs et al. 2011), and an undescribed NRPS locus, weakly similar to a *Pseudomonas syringae* locus, were specifically absent from the present *Xp_G6* genome, but present in the other three *Xenorhabdus* genomes (table 5). This genomic pattern highlights the low potential of *Xp_G6* for the synthesis of secondary metabolites. These metabolites have a wide range of bioactive properties and have been reported to be involved in antimicrobial activities, cytotoxic activity, and immunomodulation in entomopathogenic bacteria (Gualtieri et al. 2009; Park et al. 2009; Vallet-Gely et al. 2010; Fuchs et al. 2011; Stein et al. 2012; Theodore et al. 2012). Their absence from *Xp_G6* may limit the capacity of this bacterium to kill the insect on its own.

Catabolism of Amino Acid-Related Compounds

A striking feature of the *Xp_G6* genome is the lack of genes encoding proteins involved in the catabolism of amino acid-related compounds: 1) choline and glycine betaine, 2) arginine and amino-butyrate, and 3) aromatic amino acid-related metabolites (supplementary table S7, Supplementary Material online, and table 5). Both primary and secondary metabolisms are required for optimal colonization of the nematode by *Ph. luminescens* and *Xn*, but not for bacterial virulence in insects (Martens et al. 2005; Orchard and Goodrich-Blair 2005; Lango and Clarke 2010; Easom and Clarke 2012). Further studies should provide new insight into the possible involvement of such metabolic clusters in *X. poinarii* pathogenicity.

TA Systems

TA (toxin-antitoxin) systems consist of two closely linked genes, encoding a stable toxin and a labile antitoxin. TA systems are involved in stabilizing genomic regions: when the TA locus is lost, the unstable antitoxin protein disappears first, causing cell death (Van Melder and De Bast 2009). Additional roles in stress response and/or cell quality control were also recently described (Schuster and Bertram 2013). We identified 42, 12, 37 and 7 genes encoding products with antitoxin or toxin domains in *Xn*, *Xb*, *Xd* and *Xp_G6*, respectively, but intact TA loci (pairs of colocalized toxin and antitoxin genes) were totally absent from *Xp_G6* genome (table 5). Surprisingly, this feature seems to be a general feature of obligate intracellular organisms, whereas free-living slowly growing prokaryotes have a large number of such loci (Pandey and Gerdes 2005).

Table 5

Selection of Genomic Regions or Genes of Interest Regarding the Bacterial Life-Cycle in the *Xenorhabdus poinarii* G6 (*Xp_G6*), *X. doucetiae* FRM16 (*Xd*), *X. nematophila* ATCC19061 (*Xn*), and *X. bovienii* SS2004 (*Xb*) Genomes

Function	Product or Function	Gene or Locus			
		<i>Xn</i>	<i>Xb</i>	<i>Xd</i>	<i>Xp_G6</i>
T5SS (Tps)	XhlA/B	XNC1_4556-4555	XBJ1_0258-0258	XDD1_3768-3767	XPG1_0219-0220
	Putative CDI	Absent	XBJ1_1975-79	XDD1_1117-1119	Absent
	Others	XNC1_3685-3689	Absent	Absent	Absent
		XNC1_3564-3565			
Hemolysin	XaxAB	XNC1_3766-3767	XBJ1_1710-1711	XDD1_0809-0810	Absent
Insecticidal toxin	PirAB	XNC1_1143-1142	Absent	XDD1_2939-2940	XPG1_1629-1630
	Txp40	XNC1_1129	Absent	Absent	Absent
	Mcf2	XNC1_2028	Absent	XDD1_1049 (truncated)	Absent
	Mcf-like	XNC1_2265	XBJ1_2410	Absent	Absent
	Tc	3 complete loci, 2 partial loci ^a	1 complete locus, 4 partial loci ^a	Absent	Absent
NRPS-PKS	PAX-peptide synthesis	XNC1_2781-2784	XBJ1_2151-2155	XDD1_2664-2669	Absent
	Unknown metabolite synthesis	XNC1_2037-2040	XBJ1_1966-1968	XDD1_2281-2289	Absent
Amino acid-related compounds catabolism	Choline catabolism and transport	XNC1_1244-1247	XBJ1_3308-3305	XDD1_1182-1185	Absent
	Arginine and amino-butyrate metabolism	XNC1_2270-2274	XBJ1_0079-0085	XDD1_1920-1927	Absent
	Hydroxyphenylacetic acid catabolism	XNC1_0446-0449	XBJ1_3600	XDD1_0415	Absent
		XNC1_0810-0823	XBJ1_0867-0875	XDD1_1012-1026	Absent
	Phenylalanine and phenylacetic acid catabolism	XNC1_3619-3621	XBJ1_3555-3557	XDD1_0655-0657	Absent
		XNC1_4614-4627	XBJ1_0117-0128	XDD1_3917-3928	Absent
	Tyrosine catabolism	XNC1_2243-2245	XBJ1_2348-2352	XDD1_2132-2135	Absent
Regulators	Two-component system YehU/YehT	XNC1_0512-0513	XBJ1_0375-0376	XDD1_0487-0488	Absent
	Quorum sensing regulator LuxS	XNC1_1265	XBJ1_3281	XDD1_1203	Absent
	Putative RcsA activator	XNC1_1652-1653	XBJ1_1898	XDD1_2386	Absent
	Transcriptional repressor for phenylacetic acid degradation	XNC1_4631	XBJ1_0116	XDD1_0107	Absent
Entire TA systems (type II ^b)	CcdAB	XNC1_0081-0082	Absent	Absent	Absent
	HipBA	XNC1_4231-4232	Absent	XDD1_0152-0153	Absent
	MazEF	XNC1_0471-0472	XBJ1_0440-0442	XDD1_0556-0557,	Absent
				XDD1_3836-3837	
	Doc-Phd	XNC1_0202-0203	XBJ1_4379-4380	XDD1_0111-0112	Absent
	RelBE	XNC1_1940-1941	XBJ1_3187-3188	Absent	Absent
	VapBC	XNC1_0417-0418, XNC1_4632-4633	Absent	XDD1_0524-0525,	Absent
				XDD1_0577-0578	

NOTE.—Tps, two partner system; CDI, contact-dependent inhibitor.

^aFor further description, see Chaston et al. (2011).

^bPredicted after a RASTA analysis (Sevin and Barloy-Hubler 2007) and from selection of nine families described in *Escherichia coli* or *Yersinia pestis* (CcdA/CcdB, HicA/HicB, HigA/HigB, HipA/HipB, MazE/MazF, ParD/ParE, Phd/Doc, RelE/RelB, VapB/VapC).

Small Genome Size and Genomic Reduction, a General Feature of the Species *X. poinarii*

Small Genome Size

We investigated whether small genome size was a feature particular to the *Xp_G6* strain or a general feature of the species *X. poinarii*, by examining the whole genome

architecture of the other four *X. poinarii* strains (*Xp_SK72*, *Xp_AZ26*, *Xp_NC33*, and *Xp_CU01*) by I-CeuI genomic macrorestriction. I-CeuI specifically cleaves the eubacterial 23S rRNA gene of the *rm* operon (Liu and Sanderson 1995). Based on the four *Xenorhabdus* and all the Enterobacteriaceae genome sequences, we expected to obtain seven I-CeuI fragments. The number and sizes of the

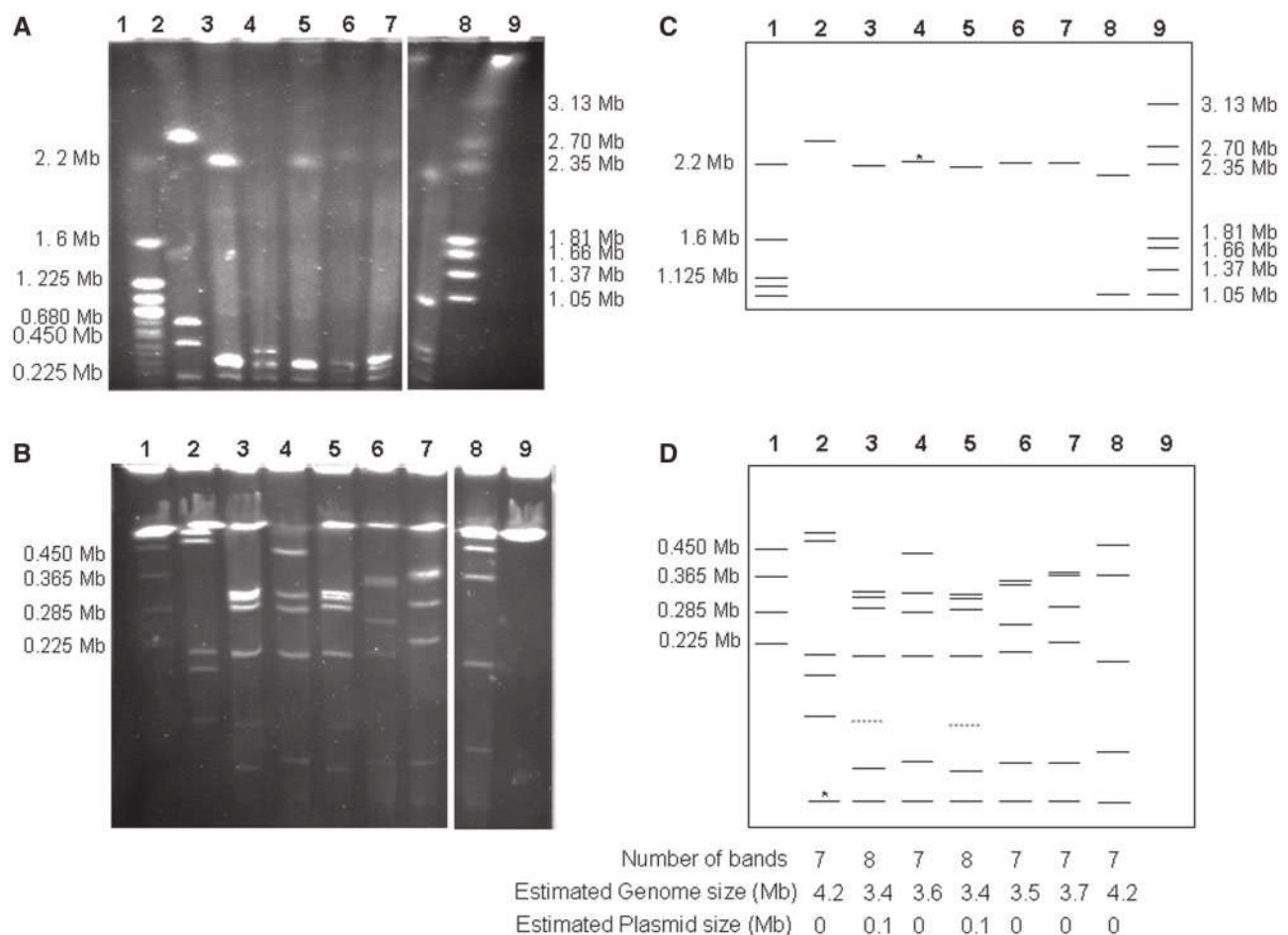


Fig. 4.—Estimation of *Xenorhabdus poinarii* strains genome size by PFGE of I-CeuI-hydrolyzed genomic DNA. The separation of I-CeuI fragments was optimized by using different electrophoresis conditions for fragments of different sizes: (A) a pulse ramp from 150 to 400 s for 45 h for I-CeuI fragments between 500 and 4,000 kb in size; (B) a pulse ramp from 5 to 35 s for 24 h for fragments of less than 500 kb in size. Schematic representations of the I-CeuI PFGE patterns under two sets of migration conditions, making it possible to separate fragments from 500 to 4,000 kb in size (C) and fragments from 10 to 500 kb in size (D), were also shown. Lane 1: *Saccharomyces cerevisiae* (strain 972h); lane 2: *X. bovienii* SS-2004; lane 3: *X. poinarii* AZ26; lane 4: *X. poinarii* G6; lane 5: *X. poinarii* SK72; lane 6: *X. poinarii* CU01; lane 7: *X. poinarii* NC33; lane 8: *X. doucetiae* FRM16; lane 9: *Hansenula wingei* (strain YB-4662-VIA). Dashed bands around 120 kb in strains *Xp_AZ26* (lane 3) and *Xp_SK72* (lane 4) correspond to fragments with a lower staining intensity, probably plasmids. *Although these bands are difficult to see on the gel photography, there were directly distinguishable on the gel and their sizes were confirmed by the theoretical I-CeuI pattern of the genome sequences of *X. bovienii* SS-2004 and *X. poinarii* G6. Fragment and genome sizes of the four unsequenced *X. poinarii* strains were evaluated with the *X. poinarii* G6, *X. bovienii* SS-2004, and *X. doucetiae* FRM16 genomes used as a reference (lanes 2, 4, and 8) and molecular weight ladders (lanes 1 and 9).

I-CeuI fragments in the *X. poinarii* strains were analyzed by PFGE, with migration conditions allowing the separation of fragments from 10 to 4,000 kb (fig. 4). In total, seven DNA bands (ranging from 40 to 2,200 kb in size) were resolved in the gel runs for *X. poinarii* strains, except for strains *Xp_AZ26* and *Xp_SK72*, for which eight bands were observed. However, the bands of about 120 kb in size obtained for *Xp_AZ26* and *Xp_SK72* were probably not I-CeuI hydrolysis fragments, corresponding instead to plasmid DNA, given that they were stained less intensely than the other bands (Teyssier et al. 2005). Finally, PFGE analysis of the *Xp_SK72*, *Xp_AZ26*, *Xp_NC33*, and *Xp_CU01* strains showed that these strains had

genomes ranging in size from 3,400 to 3,700 kb. A small genome is, therefore, a general feature of the species *X. poinarii*.

Decay of Isolated Genes

We searched for gene remnants in the *Xp_G6* genome, by TBLASTN comparisons of the *Xd* proteins against the *Xp_G6* genome. We found only 24 remnants of *Xd* genes in *Xp_G6* (indicated in [supplementary table S7, Supplementary Material online](#)). In *Xd*, these genes are not clustered together in the same area of the genome. They are instead, spread throughout the genome.

Excisions within RGP: Example of the xaxAB Locus

The *xaxAB* locus encodes a hemolysin (see above) and is specifically absent from the *Xp_G6* strain. In *Xd*, *Xn*, and *Xb*, the *xaxAB* locus is embedded within RGP_{sensu stricto} (RGP14, RGP64, and RGP28, respectively), a class of RGP specifically underrepresented in the *Xp_G6* genome. RGP14, RGP64, and RGP28 are located at the same shuffling point, flanked by the genes of the core genome *exbD* and *rdgC*. In the *Xp_G6* genome, the genomic content between the *exbD* and *rdgC* genes has been significantly reduced, with the presence of only *tetR*, *oprS* and one small gene encoding a protein of unknown function (fig. 5). We investigated the presence of *xaxAB* genes in other *X. poinarii* strains, by using pairs of primers to amplify the genomic content within the *exbD/rdgC* shuffling point (*exbD_F/rdgC_R*). As a control, we first checked that the observed sizes of the amplicons matched the theoretical sizes, for the four sequenced genomes. For *Xp_AZ26*, *Xp_NC33*, and *Xp_SK72*, the size of the amplicon obtained from the sequences between *exbD* and *rdgC* was similar to that for *Xp_G6* (about 4 kb) and sequencing of the PCR fragments revealed a similar genomic organization in all four strains (fig. 5). Surprisingly, a 10-kb fragment was obtained from the *Xp_CU01* genome. Sequencing of the extremities of the regions of the *Xp_CU01* amplicon showed the conservation of some *Xd* genes, with a shuffled genomic organization and the presence of a transposase gene, highlighting progressive genomic erosion in *Xp_CU01*. The *xaxAB* locus was not found in the position observed in *Xd* nor in that observed in *Xb/Xn*, in *Xp_CU01*. We checked that the *xaxAB* locus was not present elsewhere in the *X. poinarii* genomes, by PCR amplification with the *xaxA_F/xaxB_R* primer pair on the five *X. poinarii* strains (data not shown).

We tested the hypothesis that a deletion event occurred during *X. poinarii* speciation, by reconstructing the evolutionary history of the *xaxAB* locus within the Enterobacteriaceae family. We built and compared the topologies of an Enterobacteriaceae phylogenetic tree based on 12 house-keeping genes (fig. 6A) and a *xaxA* phylogenetic tree (fig. 6B). The Enterobacteriaceae tree grouped the genera into two clades: *Providencia–Proteus–Photorhabdus–Xenorhabdus* on the one hand and *Yersinia–Serratia–Dickeya–Edwardsiella–Erwinia–Klebsiella–Escherichia* on the other. We found that *xaxA* orthologs were present within 1) all the members of the *Providencia–Proteus–Photorhabdus–Xenorhabdus* clade other than the species *Arsenophonus nasoniae* and *X. poinarii*, and 2) only two *Yersinia* species in the other clade. These results suggest that the *xaxA* gene was present in the genome of the bacterial ancestor of the *Providencia–Proteus–Photorhabdus–Xenorhabdus* clade (node A in fig. 6A), from which it was transferred horizontally to the bacterial ancestor of *Yersinia kristensenii* and *Yersinia enterocolitica* species (node B in fig. 6A). The most parsimonious hypothesis explaining the absence of *xaxA* from *A.*

nasoniae and *X. poinarii* would be the deletion of the locus (crosses in fig. 6A). *Arsenophonus nasoniae* infects the parasitic wasp *Nasonia vitripennis* and is responsible for the son-killer trait in wasps (Wilkes et al. 2011). Interestingly, like *X. poinarii*, *A. nasoniae* has a significantly smaller (3.6 Mb) genome than its closest relatives, the genera *Proteus* and *Providencia* (4–5 Mb), and this genome is not particularly rich in phage genes or transposons (Darby et al. 2010).

Discussion

Xenorhabdus bacteria are fascinating models for studies of the mechanisms and evolution of symbioses, because they are both mutualistic symbionts in nematodes and pathogenic symbionts in insects. In recent years, *X. nematophila* has been widely analyzed, and many molecular and genomic data are now available for this species (Herbert et al. 2007; Nielsen-LeRoux et al. 2012). Several studies have focused on another species, *X. bovienii* (Chaston et al. 2011, 2013; Kim et al. 2012; Morales-Soto et al. 2012; Sugar et al. 2012). We report here the first analysis of genomic data for the species *X. poinarii*, which belongs to a phylogenetic group (clade C₁), different from that of *X. nematophila* and *X. bovienii*. We showed that all the studied strains of *X. poinarii* had attenuated virulence following their experimental injection into insects. Furthermore, our genomic analysis revealed that a small genome was a general feature of the species *X. poinarii*. This feature is not typical of the phylogenetic group, because the closely related pathogenic *Xenorhabdus* strain, *Xd*, from clade C₁ (Tailliez et al. 2010), has a genome with a size similar to those of *X. nematophila* and *X. bovienii* ones.

The small size of the genomes in the species *X. poinarii* may reflect either an ancestral state or a recent divergent evolution toward a small genome. In the first hypothesis, all *Xenorhabdus* strains would have originated from an ancestor with a small genome. In this scenario, *X. poinarii* would be the only species to have retained a small genome size, with all the others species experiencing genome expansion. However, the evolutionary scenario inferred from the phylogenetic topology based on five genes of the Xcg is not consistent with this hypothesis, because *X. poinarii* does not occupy a basal position in this phylogeny (fig. 1). According to the second hypothesis, the ancestor of the genus *Xenorhabdus* had a large genome and deletions have occurred specifically in *X. poinarii*. We observed both a slight gene decay and a paucity of RGP_{sensu stricto} in *X. poinarii* (supplementary table S7, Supplementary Material online, and table 4). We thus assume that the RGP_{sensu stricto} (i.e., hypervariable regions of the flexible genome [Ogier et al. 2010]) may have undergone deletion events in the genome of *X. poinarii*. We therefore propose that the genomes of *X. poinarii* strains have undergone a reduction with respect to those of other *Xenorhabdus* genomes, through the excision of

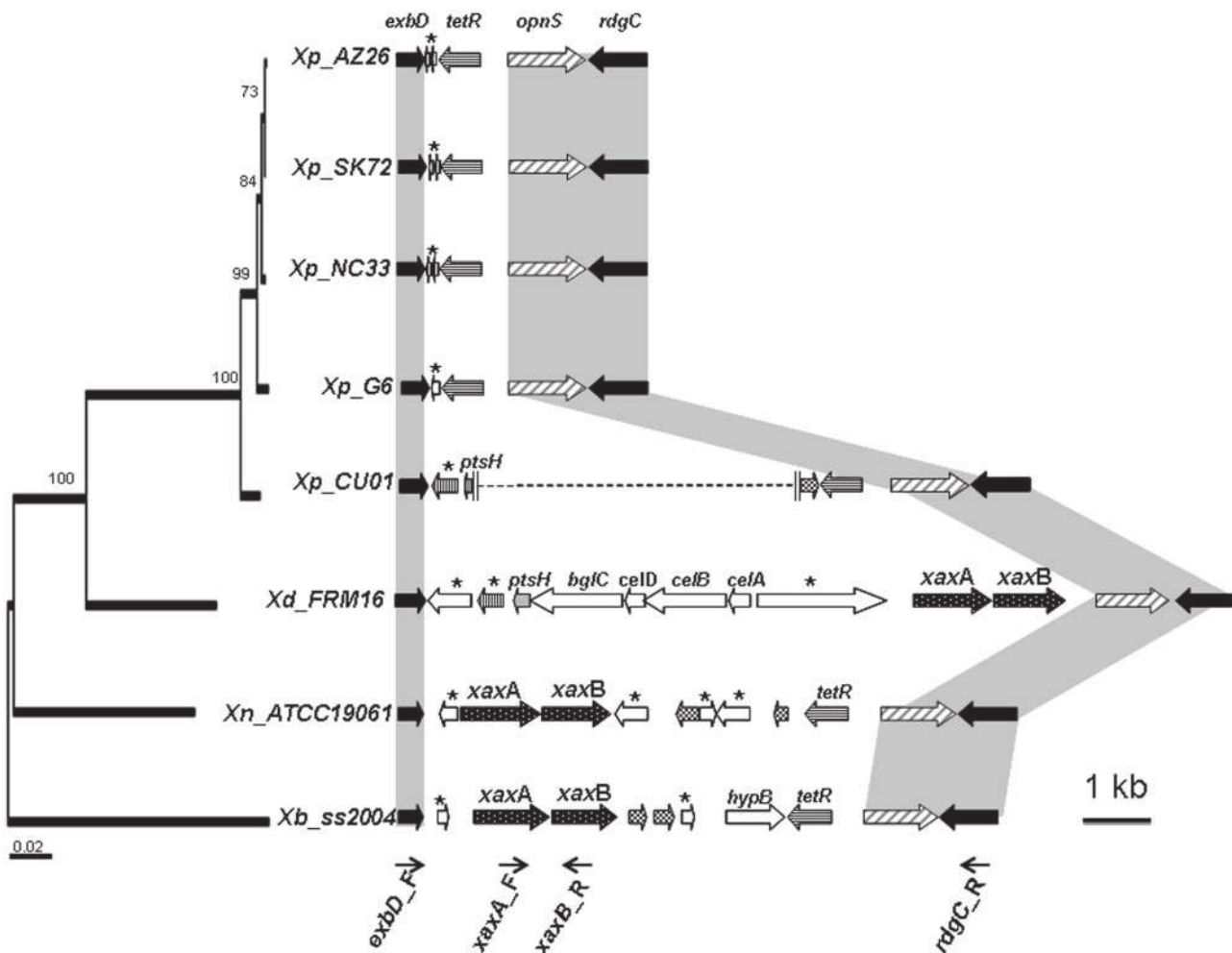


Fig. 5.—The *xaxAB* locus, its genomic context and its shuffling point *exbD/rdgC* in the *X. doucetiae* FRM16 (*Xd*), *X. nematophila* ATCC19061 (*Xn*), *X. bovienii* SS-2004 (*Xb*), *X. poinarii* G6 (*Xp_G6*), AZ26 (*Xp_AZ26*), NC33 (*Xp_NC33*), SK72 (*Xp_SK72*), and CU01 (*Xp_CU01*) genomes. The large arrows represent individual ORFs, and the names of the genes are indicated above the arrows. Genes encoding proteins of unknown function are marked with an asterisk. Orthologous genes are indicated by arrows in the same color. Black and chequered arrows represent core-genome genes and transposase genes, respectively. The thin arrows indicate the binding sites of the primers used for PCR amplification. The vertical parallel lines indicate the end of the sequenced area and the dotted lines represent an unsequenced genomic region. The cladogram was obtained by the maximum-likelihood phylogenetic analysis of five concatenated protein-coding sequences (*recA*, *gyrB*, *dnaN*, *gltX*, and *infB*), as already described in figure 1. The accession numbers of the sequences of the subsequent amplicons are HG934736 (strain AZ26), HG934737 (strain NC33), HG934738 (strain SK72), HG934739 and HG934740 (strain CU01).

genomic blocks from the flexible genome. As an illustration of how such deletion events could occur, we reconstructed the evolutionary history of the *xaxAB* locus (fig. 6), which is embedded within RGP_{sensu stricto} in the larger genomes of *Xn*, *Xb*, and *Xd* (Ogier et al. 2010). Genomic excision is the most parsimonious hypothesis explaining the absence of the *xaxAB* locus from the *Xp_G6* genome. Several examples of similar deletions have already been reported in bacteria with smaller genomes and weaker virulence than other strains from the same taxon. In *Es. coli*, the ABU strains have smaller genomes than virulent strains. These strains display frequent point mutations and IS element-mediated deletions in the *fim* genomic cluster, which is responsible for fimbrial synthesis and the

virulence of uropathogenic *Es. coli* strains (Zdziarski et al. 2008). Likewise, a 77-kb genomic region encoding methionine biosynthesis enzymes, T3SS effectors, and T4SS is deleted in the hypoaggressive *Ralstonia solanacearum* strain IPO1609. This region contains no features of GI or prophages. Its absence leads to a loss of pathogenicity (Gonzalez et al. 2011).

The compact structure and paucity of nonfunctional sequences in most prokaryotic genomes can generally be accounted for by an inherent deletional bias (Mira et al. 2001; Kuo and Ochman 2009). Host-adapted symbionts (intracellular or niche-restricted) generally have smaller genomes than the free-living bacteria from which they were derived (Moran 2002; Klasson and Andersson 2004). This evolution toward

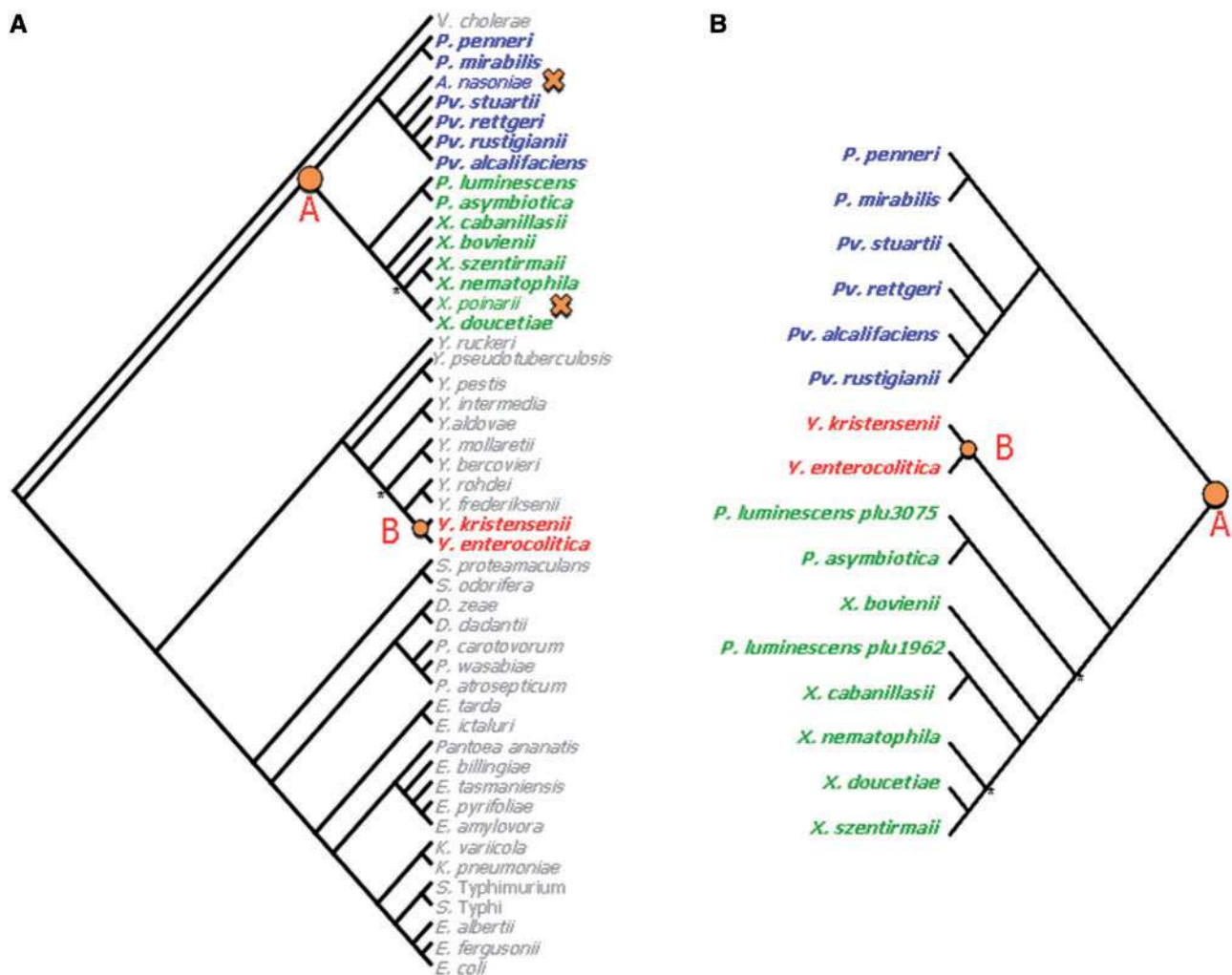


FIG. 6.—Analysis of the evolutionary history of the *xaxAB* locus by a comparison of topology between an Enterobacteriaceae tree and a *xaxA* gene tree. (A) Enterobacteriaceae phylogenetic tree based on a maximum-likelihood (ML) analysis of 12 core concatenated protein-coding sequences (*infB*, *nusA*, *polA*, *pyrD*, *rpoB*, *valS*, *cysS*, *metK*, *purA*, *tpiA*, *smgB*, *secY*). *Vibrio cholerae* sequences were used as the outgroup. Nodes are supported by bootstrap values of more than 93%, unless marked with an asterisk. (B) Phylogenetic tree based on ML analysis of the *xaxA* gene. Nodes are supported by bootstrap values of more than 86%, unless marked with an asterisk. Node A, the bacterial ancestor of the *Providencia*–*Proteus*–*Photobacterium*–*Xenorhabdus* clade, which probably contained the *xaxA* gene. Node B, bacterial ancestor of the *Yersinia kristensenii* and *Y. enterocolitica* species, to which the *xaxA* gene was probably transferred horizontally. Crosses, probable deletions of the *xaxA* gene. *Vibrio cholerae* 16961: NC_002501; *Prot. penneri* ATCC35198: PRJNA54897; *Prot. mirabilis* HI4320: NC_010554; *Arsenophonus nasoniae* DSM15247: PRJNA185551; *Prov. stuartii* ATCC25827: PRJNA54899; *Prov. rettgeri* DSM1131: PRJNA55119; *Prov. rustigianii* DSM 4541: PRJNA55071; *Prov. alcalifaciens* DSM30120: PRJNA55119; *Ph. luminescens* TT01: NC_005126.1; *Ph. asymbiotica* ATCC43949: NC_012962; *X. cabanillasii* JM26: CBXE01000001-CBXE010000496; *X. bovienii* SS-2004: NC_013892; *X. szentirmaii* DSM16638: CBXF010000001-CBXF010000164; *X. nematophila* ATCC19061: NC_014228.1; *X. poinarii* G6: FO704551; *X. doucetiae* FRM16: FO704550; *Y. ruckeri* ATCC297473: PRJNA55249; *Y. pseudotuberculosis* IP31758: NC_009708; *Y. pestis* CO92: NC_003143; *Y. intermedia* ATCC29909: PRJNA54349; *Y. aldovae* ATCC35236: PRJNA35243; *Y. mollaretii* ATCC43969: PRJNA54345; *Y. bercovieri* ATCC43970: PRJNA54343; *Y. rohdei* ATCC43380: PRJNA55247; *Y. frederiksenii* ATCC33641: PRJNA54347; *Y. kristensenii* ATCC33638: PRJNA55245; *Y. enterocolitica* 8081: NC_008800; *Serratia proteamaculans* 568: NC_0098332; *Se. odorifera* DSM4582: PRJNA40087; *Dickeya zeae* 1591: NC_012912; *Dickeya dadantii* 586: NC_013592; *Pectobacterium carotovorum* PC1: NC_012917; *Pe. wasabiae* WPP163: NC_013421; *Pe. atrosepticum* SCRI1043: NC_004547; *Edwardsiella tarda* EIB202: NC_013508; *Edwardsiella ictulari* 93-146: NC_012779.2; *Pantoea ananatis* LMG20103: NC_013956; *Erwinia billingiae* At-9b: NC_014837; *Er. tasmaniensis* Eb661: NC_014306; *Er. pyrifoliae* Ep1/96: NC_02214; *Er. amylovora* ATCC49946: NC_013971; *Klebsiella varicola* At-22: NC_013850; *K. pneumoniae* 342: NC_011283; *Salmonella enterica* Typhimurium LT2: NC_003197; *Sal. enterica* Typhi CT18: AL513382; *Escherichia albertii* TW07627: PRJNA55089; *Es. fergusonii* ATCC35469T: NC_011740; *Es. coli* K12: NC_000913).

reduced genomes in host-adapted symbionts may be due to genetic drift (Mira et al. 2001; Silva et al. 2001; Nilsson et al. 2005). Indeed, because of sequestration in the host or the occurrence of major lifecycle stages within host, genome of host-adapted bacterial symbionts has reduced opportunity for counterbalancing deletional bias by HGT compared with free-living bacteria. Moreover, the restriction to specific hosts also promotes small bacterial population size, asexuality and population bottleneck for transmission, favoring the persistence of slightly deleterious mutations (Muller's ratchet). The accumulation of these mutations entails a fitness cost to the bacterium and leads to DNA loss (McCutcheon and Moran 2012). The hallmarks of early stages of genetic drift-driven genomic reduction are an inordinately large number of pseudogenes, a low coding capacity, a high levels of transposable elements, phage-derived sequences, and a massive expansion of IS elements (Toh et al. 2006; Gavotte et al. 2007; Song et al. 2010; Leclercq et al. 2011). Positive selection may also be a significant driver of reductive genome evolution (Koskiniemi et al. 2012). In free-living bacteria growing on a restricted resources in a constant environment, positive selection minimizes the material costs of cellular replication, by reducing genome length (streamlining) (Giovannoni et al. 2005). Large-scale deletions of accessory genes may also be beneficial in a selective environment (Lee and Marx 2012). Comparisons of the large genomes of *Xd*, *Xn*, and *Xb* with the small genome of *Xp_G6* highlighted the deletion processes, by revealing large deletions spanning multiple genes (RGP_{sensu stricto}) and small deletions of few nucleotides (gene remnants), together with equivalent coding capacity and the presence of similar numbers of GI, prophages, IS elements, pseudogenes, and phage genes (tables 3 and 4) in the four genomes. The features of the small *Xp_G6* genome are therefore rather consistent with a mechanism of selection-driven gene loss in the flexible genome than with a mechanism of genomic reduction dominated by a genetic drift. However, we cannot totally exclude the possibility that genome reduction was also promoted by a population bottleneck. Indeed, as a large proportion of *St. glaseri* nematodes is naturally aposymbiotic (Akhurst 1986), the transmission of *X. poinarii* to the next generation of *St. glaseri* nematodes would involve only a small bacterial population.

The *Xenorhabdus* lifecycle is characterized by a combination of pathogenic and mutualistic lifestyles and the routine, alternate infection of two kinds of invertebrate hosts. The reduced genome of *X. poinarii* does not prevent the bacterial/nematode symbiosis from having a lifestyle similar to that of other *Xenorhabdus* species. What is the evolutionary and ecological significance of genomic reduction in *X. poinarii*? Selection-driven genome reduction in mutualistic and pathogenic bacteria often results from a greater reliance on the host (Moran et al. 2008). We demonstrated the avirulence of *X. poinarii*, through direct bacterial injections into two lepidopteran insect species (table 2), as previously reported for several

species from the Lepidoptera and Coleoptera (Akhurst 1986; Converse and Grewal 1998; Rosa et al. 2002; Ansari et al. 2003). It is possible that this phylogenetic bacterial group displays greater insect specificity than other *Xenorhabdus* species. However, no insects susceptible to direct injections of *X. poinarii* have yet been identified. Alternatively, the bacterial functions necessary for virulence following direct bacterial injection present in other *Xenorhabdus* species but absent from *X. poinarii* might be complemented by the nematode partner. Further studies are required to determine the possible role of such complementation in insect virulence.

In conclusion, this first genomic study on the species *X. poinarii* provides insight into the mechanisms underlying genomic erosion in symbiotic bacteria. In addition, our comparison of the genomes of this avirulent species with those of other *Xenorhabdus* species paves the way for the identification of new candidate virulence factors in the genus *Xenorhabdus*.

Supplementary Material

Supplementary tables S1–S7 are available at *Genome Biology and Evolution* online (<http://www.gbe.oxfordjournals.org/>).

Acknowledgments

The authors thank Nadège Ginibre for assistance with insect pathology assays and Mathieu Sicard for his careful reading of the discussion section. They also thank the INRA MIGALE bioinformatics platform <http://migale.jouy.inra.fr> for providing computing resources. The paper benefited from the comments of John McCutcheon, and three anonymous reviewers. This study was supported by INRA (grant SPE 2010-1133-01, "Génomique comparative et évolutive de nouveaux facteurs d'adaptation de la bactérie entomopathogène *Xenorhabdus* à ses hôtes insectes") and by Université Montpellier 2 (grant 2011 "Génomique comparative et fonctionnelle de nouveaux facteurs d'adaptation de la bactérie entomopathogène *Xenorhabdus* à ses hôtes insectes").

Literature Cited

- Akhurst RJ. 1982. Antibiotic-activity of *Xenorhabdus* spp, bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes of the families Heterorhabditidae and Steinernematidae. *J Gen Microbiol.* 128: 3061–3065.
- Akhurst RJ. 1983. Taxonomic study of *Xenorhabdus*, a genus of bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes. *Int J Syst Bacteriol.* 33:38–45.
- Akhurst RJ. 1986. *Xenorhabdus nematophilus* subsp *poinarii*—its interaction with insect pathogenic nematodes. *Syst Appl Microbiol.* 8: 142–147.
- Akhurst RJ, Boemare NE. 1988. A numerical taxonomic study of the genus *Xenorhabdus* (Enterobacteriaceae) and proposed elevation of the subspecies of *Xenorhabdus-Nematophilus* to species. *J Gen Microbiol.* 134:1835–1845.

- Ansari MA, Tirry L, Moens M. 2003. Entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria for the biological control of *Hoplia philanthus* (Coleoptera : Scarabaeidae). *Biol Control*. 28:111–117.
- Aury JM, et al. 2008. High quality draft sequences for prokaryotic genomes using a mix of new sequencing technologies. *BMC Genomics* 9:603.
- Bachmann BO, Ravel J. 2009. Methods for *in silico* prediction of microbial polyketide and non ribosomal peptide biosynthetic pathways from DNA sequence data. *Methods Enzymol*. Chapter 8, 458:181–217.
- Bode HB. 2009. Entomopathogenic bacteria as a source of secondary metabolites. *Curr Opin Chem Biol*. 13:224–230.
- Bowen D, et al. 1998. Insecticidal toxins from the bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Science* 280:2129–2132.
- Brown SE, et al. 2006. Txp40, a ubiquitous insecticidal toxin protein from *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* bacteria. *Appl Environ Microbiol*. 72:1653–1662.
- Castresana J. 2000. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol Biol Evol*. 17:540–552.
- Chaston J, Goodrich-Blair H. 2010. Common trends in mutualism revealed by model associations between invertebrates and bacteria. *FEMS Microbiol Rev*. 34:41–58.
- Chaston JM, Murfin KE, Heath-Heckman EA, Goodrich-Blair H. 2013. Previously unrecognized stages of species-specific colonization in the mutualism between *Xenorhabdus* bacteria and *Steinernema* nematodes. *Cell Microbiol*. 15:1545–1559.
- Chaston JM, et al. 2011. The entomopathogenic bacterial endosymbionts *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: convergent lifestyles from divergent genomes. *PLoS One* 6:e27909.
- Converse V, Grewal PS. 1998. Virulence of entomopathogenic nematodes to the western masked chafer *Cyclocephala hirta* (Coleoptera: Scarabaeidae). *J Econ Entomol*. 91:428–432.
- Cowles KN, Goodrich-Blair H. 2005. Expression and activity of a *Xenorhabdus nematophila* haemolysin required for full virulence towards *Manduca sexta* insects. *Cell Microbiol*. 7:899–900.
- Crawford JM, Portmann C, Zhang X, Roeffaers MBJ, Clardy J. 2012. Small molecule perimeter defense in entomopathogenic bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109:10821–10826.
- Daborn PJ, et al. 2002. A single *Photorhabdus* gene, makes caterpillars floppy (*mcf*), allows *Escherichia coli* to persist within and kill insects. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:10742–10747.
- Dale C, Moran NA. 2006. Molecular interactions between bacterial symbionts and their hosts. *Cell* 126:453–465.
- Darby AC, et al. 2010. Characteristics of the genome of *Arsenophonus nasoniae*, son-killer bacterium of the wasp *Nasonia*. *Insect Mol Biol*. 19:75–89.
- Dereeper A, et al. 2008. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res*. 36:W465–W469.
- Dowling AJ, et al. 2007. The Mcf1 toxin induces apoptosis via the mitochondrial pathway and apoptosis is attenuated by mutation of the BH3-like domain. *Cell Microbiol*. 9:2470–2484.
- Duchaud E, et al. 2003. The genome sequence of the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Nat Biotechnol*. 21:1307–1313.
- Easom CA, Clarke DJ. 2012. HdfR is a regulator in *Photorhabdus luminescens* that modulates metabolism and symbiosis with the nematode *Heterorhabditis*. *Environ Microbiol*. 14:953–966.
- Edgar RC. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*. 32:1792–1797.
- Ehlers RU. 2001. Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection. *Appl Microbiol Biotechnol*. 56:623–633.
- Ehlers RU, Wulff A, Peters A. 1997. Pathogenicity of axenic *Steinernema feltiae*, *Xenorhabdus bovienii*, and the bacto-helminthic complex to larvae of *Tipula oleracea* (Diptera) and *Galleria mellonella* (Lepidoptera). *J Invertebr Pathol*. 69:212–217.
- Fallon DJ, et al. 2006. Effect of entomopathogenic nematodes on *Plectrodera scalator* (Fabricius) (Coleoptera: Cerambycidae). *J Invertebr Pathol*. 92:55–57.
- Felsenstein J. 1988. Phylogenies from molecular sequences—inference and reliability. *Annu Rev Genet*. 22:521–565.
- Fischer-Le Saux M, Arteaga-Hernandez E, Mracek Z, Boemare NE. 1999. The bacterial symbiont *Xenorhabdus poinarii* (Enterobacteriaceae) is harbored by two phylogenetic related host nematodes: the entomopathogenic species *Steinernema cubanum* and *Steinernema glaseri* (Nematoda: Steinernematidae). *FEMS Microbiol Ecol*. 29:149–157.
- Fischer-Le Saux M, Viallard V, Brunel B, Normand P, Boemare NE. 1999. Polyphasic classification of the genus *Photorhabdus* and proposal of new taxa: *P. luminescens* subsp *luminescens* subsp nov., *P. luminescens* subsp *akhurstii* subsp nov., *P. luminescens* subsp *laumondii* subsp nov., *P. temperata* sp nov., *P. temperata* subsp *temperata* subsp nov and *P. asymbiotica* sp nov. *Int J Syst Bacteriol*. 49:1645–1656.
- Forst S, Dowds B, Boemare N, Stackebrandt E. 1997. *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp.: bugs that kill bugs. *Annu Rev Microbiol*. 51:47–72.
- Fuchs SW, Proschak A, Jaskolla TW, Karas M, Bode HB. 2011. Structure elucidation and biosynthesis of lysine-rich cyclic peptides in *Xenorhabdus nematophila*. *Org Biomol Chem*. 9:3130–3132.
- Gaudriault S, et al. 2006. Whole-genome comparison between *Photorhabdus* strains to identify genomic regions involved in the specificity of nematode interaction. *J Bacteriol*. 188:809–814.
- Gavotte L, et al. 2007. A survey of the bacteriophage WO in the endosymbiotic bacteria *Wolbachia*. *Mol Biol Evol*. 24:427–435.
- Giovannoni SJ, et al. 2005. Genome streamlining in a cosmopolitan oceanic bacterium. *Science* 309:1242–1245.
- Gomez-Valero L, Rocha EPC, Latorre A, Silva FJ. 2007. Reconstructing the ancestor of *Mycobacterium leprae*: the dynamics of gene loss and genome reduction. *Genome Res*. 17:1178–1185.
- Gonzalez A, Plener L, Restrepo S, Boucher C, Genin S. 2011. Detection and functional characterization of a large genomic deletion resulting in decreased pathogenicity in *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 strains. *Environ Microbiol*. 13:3172–3185.
- Goodrich-Blair H, Clarke DJ. 2007. Mutualism and pathogenesis in *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: two roads to the same destination. *Mol Microbiol*. 64:260–268.
- Gualtieri M, Aumelas A, Thaler JO. 2009. Identification of a new antimicrobial lysine-rich cyclolipopeptide family from *Xenorhabdus nematophila*. *J Antibiot*. 62:295–302.
- Guglielmini J, Quintais L, Garcillan-Barcia MP, de la Cruz F, Rocha EPC. 2011. The repertoire of ICE in prokaryotes underscores the unity, diversity, and ubiquity of conjugation. *PLoS Genet*. 7:e1002222.
- Han RC, Ehlers RU. 2000. Pathogenicity, development, and reproduction of *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae* under axenic *in vivo* conditions. *J Invertebr Pathol*. 75:55–58.
- Herbert EE, Cowles KN, Goodrich-Blair H. 2007. CpxRA regulates mutualism and pathogenesis in *Xenorhabdus nematophila*. *Appl Environ Microbiol*. 73:7826–7836.
- Hinchliffe SJ, Hares MC, Dowling AJ, Ffrench-Constant RH. 2010. Insecticidal toxins from the *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* bacteria. *Open Toxicology J*. 3:83–100.
- Hussa EA, Goodrich-Blair H. 2013. It takes a village: ecological and fitness impacts of multipartite mutualism. *Annu Rev Microbiol*. 67:161–178.
- Jubelin G, et al. 2011. Studies of the dynamic expression of the *Xenorhabdus* *FlaAZ* regulon reveal atypical iron-dependent regulation of the flagellin and haemolysin genes during insect infection. *Environ Microbiol*. 13:1271–1284.
- Jumas-Bilak E, Michaux-Charachon S, Bourg G, O'Callaghan D, Ramuz M. 1998. Differences in chromosome number and genome rearrangements in the genus *Brucella*. *Mol Microbiol*. 27:99–106.

- Kim SK, Flores-Lara Y, Stock SP. 2012. Morphology and ultrastructure of the bacterial receptacle in *Steinernema* nematodes (Nematoda: Steinernematidae). *J Invertebr Pathol.* 110:366–374.
- Klasson L, Andersson SGE. 2004. Evolution of minimal-gene-sets in host-dependent bacteria. *Trends Microbiol.* 12:37–43.
- Koskiniemi S, Sun S, Berg OG, Andersson DI. 2012. Selection-driven gene loss in bacteria. *PLoS Genet.* 8:e1002787.
- Kuo CH, Ochman H. 2009. Deletional bias across the three domains of life. *Genome Biol Evol.* 1:145–152.
- Lang AE, et al. 2010. *Photorhabdus luminescens* toxins ADP-ribosylate actin and RhoA to force actin clustering. *Science* 327:1139–1142.
- Lango L, Clarke DJ. 2010. A metabolic switch is involved in lifestyle decisions in *Photorhabdus luminescens*. *Mol Microbiol.* 77:1394–1405.
- Leclercq S, Giraud I, Cordaux R. 2011. Remarkable abundance and evolution of mobile group II introns in *Wolbachia* bacterial endosymbionts. *Mol Biol Evol.* 28:685–697.
- Lee MC, Marx CJ. 2012. Repeated, selection-driven genome reduction of accessory genes in experimental populations. *PLoS Genet.* 8:e1002651.
- Lerat E, Daubin V, Moran NA. 2003. From gene trees to organismal phylogeny in prokaryotes: the case of the gamma-proteobacteria. *PLoS Biol.* 1:101–109.
- Lima-Mendez G, Van Helden J, Toussaint A, Leprieux R. 2008. Prophinder: a computational tool for prophage prediction in prokaryotic genomes. *Bioinformatics* 24:863–865.
- Liu SL, Sanderson KE. 1995. I-Ceul reveals conservation of the genome of independent strains of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol.* 177:3355–3357.
- Martens EC, Russell FM, Goodrich-Blair H. 2005. Analysis of *Xenorhabdus nematophila* metabolic mutants yields insight into stages of *Steinernema carpocapsae* nematode intestinal colonization. *Mol Microbiol.* 58:28–45.
- McCutcheon JP, Moran NA. 2012. Extreme genome reduction in symbiotic bacteria. *Nature Rev Microbiol.* 10:13–26.
- Miele V, Penel S, Duret L. 2011. Ultra-fast sequence clustering from similarity networks with SiLiX. *BMC Bioinformatics* 12:116.
- Mira A, Ochman H, Moran NA. 2001. Deletional bias and the evolution of bacterial genomes. *Trends Genet.* 17:589–596.
- Morales-Soto N, Gaudriault S, Ogier JC, Thappeta KRV, Forst S. 2012. Comparative analysis of P2-type remnant prophage loci in *Xenorhabdus bovienii* and *Xenorhabdus nematophila* required for xenorhabdicolin production. *FEMS Microbiol Lett.* 333:69–76.
- Moran NA. 2002. Microbial minimalism: genome reduction in bacterial pathogens. *Cell* 108:583–586.
- Moran NA, McCutcheon JP, Nakabachi A. 2008. Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. *Annu Rev Genet.* 42:165–190.
- Moran NA, Plague GR. 2004. Genomic changes following host restriction in bacteria. *Curr Opin Genet Dev.* 14:627–633.
- Nielsen-LeRoux C, Gaudriault S, Ramarao N, Lereche D, Givaudan A. 2012. How the insect pathogen bacteria *Bacillus thuringiensis* and *Xenorhabdus/Photorhabdus* occupy their hosts. *Curr Opin Microbiol.* 15:220–231.
- Nilsson AI, et al. 2005. Bacterial genome size reduction by experimental evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:12112–12116.
- Ogier JC, et al. 2010. Units of plasticity in bacterial genomes: new insight from the comparative genomics of two bacteria interacting with invertebrates, *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. *BMC Genomics* 11:568.
- Orchard SS, Goodrich-Blair H. 2005. An encoded N-terminal extension results in low levels of heterologous protein production in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact.* 4:22.
- Pandey DP, Gerdes K. 2005. Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. *Nucleic Acids Res.* 33:966–976.
- Park D, et al. 2009. Genetic analysis of xenocoumarin antibiotic production in the mutualistic bacterium *Xenorhabdus nematophila*. *Mol Microbiol.* 73:938–949.
- Penn O, et al. 2010. GUIDANCE: a web server for assessing alignment confidence scores. *Nucleic Acids Res.* 38:23–28.
- Poinar GO Jr, Thomas GM. 1966. Significance of *Achromobacter nematophilus* Poinar and Thomas (Achromobacteraceae: Eubacteriales) in the development of the nematode, DD-136 (*Neoaplectana* sp. Steinernematidae). *Parasitology* 56:385–390.
- Poitout S. 1970. Elevage de plusieurs espèces de lépidoptères Noctuidae sur milieu artificiel riche et sur milieu artificiel simplifié. *Ann Zool Ecol Anim.* 2:79–91.
- Posada D, Crandall KA. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14:817–818.
- Richards GR, Goodrich-Blair H. 2009. Masters of conquest and pillage: *Xenorhabdus nematophila* global regulators control transitions from virulence to nutrient acquisition. *Cell Microbiol.* 11:1025–1033.
- Rosa JS, Cabral C, Simoes N. 2002. Differences between the pathogenic processes induced by *Steinernema* and *Heterorhabditis* (Nemata: Rhabditida) in *Pseudaletia unipuncta* (Insecta: Lepidoptera). *J Invertebr Pathol.* 80:46–54.
- Schuster CF, Bertram R. 2013. Toxin-antitoxin systems are ubiquitous and versatile modulators of prokaryotic cell fate. *FEMS Microbiol Lett.* 340:73–85.
- Seth-Smith HMB, et al. 2012. Structure, diversity, and mobility of the *Salmonella* pathogenicity island 7 family of integrative and conjugative elements within Enterobacteriaceae. *J Bacteriol.* 194:1494–1504.
- Sevin EW, Barloy-Hubler F. 2007. RASTA-Bacteria: a web-based tool for identifying toxin-antitoxin loci in prokaryotes. *Genome Biol.* 8:R155.
- Sicard M, et al. 2004. Stages of infection during the tripartite interaction between *Xenorhabdus nematophila*, its nematode vector, and insect hosts. *Appl Environ Microbiol.* 70:6473–6480.
- Silva FJ, Latorre A, Moya A. 2001. Genome size reduction through multiple events of gene disintegration in *Buchnera* APS. *Trends Genet.* 17:615–618.
- Song H, et al. 2010. The early stage of bacterial genome-reductive evolution in the host. *PLoS Pathog.* 6:e1000922.
- Stein ML, et al. 2012. One-shot NMR analysis of microbial secretions identifies highly potent proteasome inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109:18367–18371.
- Sugar DR, et al. 2012. Phenotypic variation and host interactions of *Xenorhabdus bovienii* SS-2004, the entomopathogenic symbiont of *Steinernema jolietii* nematodes. *Environ Microbiol.* 14:924–939.
- Tailliez P, Pagès S, Edgington S, Tymo LM, Buddie AG. 2012. Description of *Xenorhabdus magdalenensis* sp. nov., the symbiotic bacterium associated with *Steinernema australe*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 62:1761–1765.
- Tailliez P, Pagès S, Ginibre N, Boemare N. 2006. New insight into diversity in the genus *Xenorhabdus*, including the description of ten novel species. *Int J Syst Evol Microbiol.* 56:2805–2818.
- Tailliez P, et al. 2010. Phylogeny of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* based on universally conserved protein-coding sequences and implications for the taxonomy of these two genera. Proposal of new taxa: *X. vietnamensis* sp. nov., *P. luminescens* subsp. *caribbeanensis* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *hainanensis* subsp. nov., *P. temperata* subsp. *khanii* subsp. nov., *P. temperata* subsp. *tasmaniensis* subsp. nov., and the reclassification of *P. luminescens* subsp. *thracensis* as *P. temperata* subsp. *thracensis*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 60:1921–1937.
- Teyssier C, et al. 2005. Pulsed-field gel electrophoresis to study the diversity of whole-genome organization in the genus *Ochrobactrum*. *Electrophoresis* 26:2898–2907.

- Theodore CM, King JB, You JL, Cichewicz RH. 2012. Production of cytotoxic glidobactins/luminmycins by *Photobacterium asymbiotica* in liquid media and live crickets. *J Nat Prod.* 75:2007–2011.
- Toh H, et al. 2006. Massive genome erosion and functional adaptations provide insights into the symbiotic lifestyle of *Sodalis glossinidius* in the tsetse host. *Genome Res.* 16:149–156.
- Treangen TJ, Abraham AL, Touchon M, Rocha EPC. 2009. Genesis, effects and fates of repeats in prokaryotic genomes. *FEMS Microbiol Rev.* 33: 539–571.
- Vallenet D, et al. 2013. MicroScope—an integrated microbial resource for the curation and comparative analysis of genomic and metabolic data. *Nucleic Acids Res.* 41:E636–E647.
- Vallet-Gely I, Opota O, Boniface A, Novikov A, Lemaitre B. 2010. A secondary metabolite acting as a signalling molecule controls *Pseudomonas entomophila* virulence. *Cell Microbiol.* 12:1666–1679.
- Van Melder L, De Bast MS. 2009. Bacterial toxin-antitoxin systems: more than selfish entities? *PLoS Genet.* 5:e100043.
- Varani AM, Siguier P, Gournay E, Charneau V, Chandler M. 2011. ISsaga is an ensemble of web-based methods for high throughput identification and semi-automatic annotation of insertion sequences in prokaryotic genomes. *Genome Biol.* 12:R30.
- Veyrier FJ, Dufort A, Behr MA. 2011. The rise and fall of the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Trends Microbiol.* 19: 156–161.
- Vigneux F, et al. 2007. The *xaxAB* genes encoding a new apoptotic toxin from the insect pathogen *Xenorhabdus nematophila* are present in plant and human pathogens. *J Biol Chem.* 282: 9571–9580.
- Wang Y, Gaugler R, Cui L. 1994. Variations in immune response of *Popillia japonica* and *Acheta domesticus* to *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema* species. *J Nematol.* 26:11–18.
- Waterfield NR, Kamita SG, Hammock BD, Ffrench-Constant R. 2005. The *Photobacterium* Pir toxins are similar to a developmentally regulated insect protein but show no juvenile hormone esterase activity. *FEMS Microbiol Lett.* 245:47–52.
- Waterfield NR, Bowen DJ, Fetherston JD, Perry RD, Ffrench-Constant RH. 2001. The *tc* genes of *Photobacterium*: a growing family. *Trends Microbiol.* 9:185–191.
- Waterfield NR, Daborn PJ, Ffrench-Constant RH. 2002. Genomic islands in *Photobacterium*. *Trends Microbiol.* 10:541–545.
- Waterfield NR, et al. 2003. The insecticidal toxin makes caterpillars floppy 2 (Mcf2) shows similarity to HrmA, an avirulence protein from a plant pathogen. *FEMS Microbiol Lett.* 229: 265–270.
- Wilkes TE, et al. 2011. The genus *Arsenophonus*. In: Zchori-Fein E, Bourtzis K, editors. *Manipulative tenants*. Boca Raton (FL): CRC Press. p. 225–244.
- Zdziarski J, Svanborg C, Wullt B, Hacker J, Dobrindt U. 2008. Molecular basis of commensalism in the urinary tract: low virulence or virulence attenuation? *Infect Immun.* 76:695–703.

Associate editor: John McCutcheon

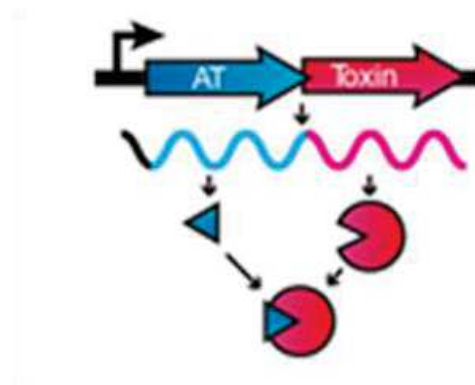


Figure 11. Système toxine-antitoxine de type II (Schuster & Bertram, 2013). Dans les systèmes TA de type II, la toxine et l'antitoxine sont toutes deux de nature protéique. Le locus TA est un opéron composé d'un gène d'antitoxine situé en amont d'un gène de toxine. En temps normal, l'antitoxine, instable, est exprimée en continu, ce qui permet de bloquer l'action de la toxine.

II- Les systèmes toxine-antitoxine chez *Xenorhabdus*

A. Introduction

Les systèmes toxine-antitoxine (TA) sont des opérons composés de deux gènes, largement répandus chez les procaryotes (Pandey & Gerdes, 2005; Leplae *et al.*, 2011). Il s'agit d'opérons, codant une toxine protéique et une antitoxine qui peut être une protéine de faible poids moléculaire ou un ARN non codant (Schuster & Bertram, 2013; Gerdes & Maisonneuve, 2012). A ce jour, cinq types de systèmes TA ont été décrits (Schuster & Bertram, 2013) ; nous intéresserons ici aux systèmes TA de type II, où la toxine et l'antitoxine sont tous deux de nature protéique.

Les toxines ciblent des processus essentiels à la survie cellulaire : la réplication (CcdB et ParE ciblent par exemple l'ADN gyrase), la transcription (MazE et VapC sont des endoribonucléases dégradant les ARN messagers) ou la traduction (RelE et HigB clivent les ARN messagers en cours de traduction) (Van Melderen & Saavedra De Bast 2009). L'antitoxine est exprimée en continu et empêche en temps normal l'action de la toxine (Figure 11). Cependant le locus du système TA est perdu, l'antitoxine, plus labile que la toxine, disparaît en premier, et la toxine entraîne alors la mort cellulaire (Van Melderen & Saavedra De Bast, 2009; Schuster & Bertram, 2013).

Chez les bactéries, les systèmes TA jouent deux rôles majeurs :

- Ils stabilisent les plasmides et des îlots génomiques. Ainsi, si une région génomique contenant un locus TA est perdue, la bactérie meurt. Par exemple, les prophages P1 et Qin sont stabilisés par un locus *phd-doc* et *relBE*, respectivement (Lehnherr *et al.*, 1993; Gotfredsen & Gerdes, 1998). Chez *Vibrio* sp., les superintégrons contiennent des loci *ccdAB*, *higBA*, *relBE* ou *parDE* (Szekeres *et al.*, 2007; Christensen-Dalsgaard & Gerdes, 2006; Guérout *et al.*, 2013).
- Ils sont impliqués la résistance au stress. Par exemple, RelBE et MazEF sont impliqués dans la formation de biofilms et l'apparition de bactéries persistantes, des cellules en état de dormance capables de résister à des concentrations létales d'antibiotiques (Leung & Lévesque, 2012; Wang & Wood, 2011; Tashiro *et al.*, 2012; Amitai *et al.*, 2004).

Dans le cadre de l'analyse génomique de la souche *X. poinarii* G6, nous avons fait l'inventaire des systèmes TA de type II chez les différentes espèces de *Xenorhabdus* étudiées.

B. Matériel et méthodes

Les systèmes toxine-antitoxine ont été recherchés par l'outil RASTA-Bacteria (Sevin & Barloy-Hubler 2007). Nous avons choisi d'étudier 9 systèmes toxines-antitoxines couramment retrouvés dans les

Tableau 1. Loci TA chez *Xenorhabdus*. Les gènes dans lesquels un domaine a été identifié lors de l'analyse RASTA sont indiqués en gras. Les gènes de toxines sont indiqués en rouge.

Famille TA	<i>X. nematophila</i>	<i>X. bovienii</i> SS-2004	<i>X. doucetiae</i>	<i>X. poinarii</i>
<i>ccdAB</i>	XNC1_0081 (<i>ccdA</i>)-XNC1_0082 (<i>ccdB</i>) XNC1_1373-XNC1_1374 (<i>ccdA</i>) XNC1_3771 (<i>ccdB</i>)	-	XDD1v4_0684 (<i>ccdA</i>)	-
<i>hicAB</i>	XNC1_2390-XNC1_2391 (<i>hicB</i>)	XBJ1_2793-XBJ1_2794 (<i>hicB</i>)	-	-
<i>higBA</i>	-	XBJ1_1255-XBJ1_1256 (<i>higB</i>)	-	XPG1v4_0324-XPG1v4_0325 (<i>higB</i>)
<i>hipAB</i>	XNC1_0103-XNC1_0104 (<i>hipB</i>) XNC1_0540 (<i>hipB</i>) XNC1_2832-XNC1_2833 (<i>hipA</i>) XNC1_4123 (<i>hipB</i>) XNC1_4231 (<i>hipA</i>)-XNC1_4232 (<i>hipB</i>) XNC1_p0180 (<i>hipB</i>)-XNC1_p0181	-	XDD1v4_0152 (<i>hipA</i>)-XDD1v4_0153 (<i>hipB</i>) XDD1v4_0724 (<i>hipB</i>)-XDD1v4_0725 XDD1v4_3264 (<i>hipB</i>)-XDD1v4_3265 XDD1v4_3932 (<i>hipA</i>)-XDD1v4_3933	XPG1v4_1013 (<i>hipB</i>)
<i>mazEF</i>	XNC1_0471 (<i>mazE</i>)-XNC1_0472 (<i>mazF</i>) XNC1_0530-XNC1_0532 (<i>mazF</i>) XNC1_4457-XNC1_4458 (<i>mazF</i>)	XBJ1_0440 (<i>mazF</i>)-XBJ1_0442 (<i>mazE</i>)	XDD1v4_0557 (<i>mazE</i>)-XDD1v4_0556 (<i>mazF</i>) XDD1v4_0560 (<i>mazF</i>)-XDD1v4_0561 XDD1v4_3836 (<i>mazF</i>)-XDD1v4_3837 (<i>mazE</i>)	-
<i>parDE</i>	XNC1_0543 (<i>parE</i>) XNC1_2024 (<i>parE</i>) XNC1_2254 (<i>parE</i>)-XNC1_2255 XNC1_4603 (fragment <i>parE</i>)-XNC1_4604	XBJ1_4274 (fragment <i>parE</i>)	XDD1v4_0465 (<i>parE</i>)-XDD1v4_0466 XDD1v4_0539-XDD1v4_0540 (<i>parE</i>) XDD1v4_0678-XDD1v4_0679 (fragment <i>parE</i>) XDD1v4_0680 (fragment <i>parE</i>) XDD1v2_p0002-XDD1v2_p0003 (<i>parD</i>)	XPG1v4_3084-XPG1v4_3083 (<i>parE</i>)
<i>phd-doc</i>	XNC1_0202 (<i>phd</i>)-XNC1_0203 (<i>doc</i>) XNC1_4495 (<i>phd</i>)	XBJ1_4379 (<i>phd</i> 1)-XBJ1_4380 (<i>doc</i>) XBJ1_4384 (<i>phd</i> 2)	XDDv4_0111 (<i>doc</i>)-XDDv4_0112 (<i>phd</i>) XDD1v4_3224-XDD1v4_3225 (<i>phd</i>)	-
<i>relBE</i>	XNC1_1940 (<i>relE</i>)-XNC1_1941 (<i>relB</i>) XNC1_2946 (<i>relE</i>)-XNC1_2947	XBJ1_3187 (<i>relE</i>)-XBJ1_3188 (<i>relB</i>)	XDD1v4_2305 (fragment <i>relE</i>) XDD1v4_2306 (fragment <i>relE</i>) XDD1v4_2307 (fragment <i>relB</i>)	XPG1v4_0357-XPG1v4_0356 (<i>relE</i>)
<i>vapBC</i>	XNC1_0417 (<i>vapB</i>)-XNC1_0418 (<i>vapC</i>) XNC1_4632 (<i>vapC</i>)-XNC1_4633 (<i>vapB</i>)	-	XDD1v4_0524 (<i>vapB</i>)-XDD1v4_0525 (<i>vapC</i>) XDD1v4_0577 (<i>vapC</i>)-XDD1v4_0578 (<i>vapB</i>) XDD1v4_0681 (<i>vapB</i>)-XDD1v4_0682	-
Total	42	12	37	7
Systèmes TA complets	7	3	6	0

génomés bactériens : CcdAB, HicAB, HigBA, HipAB, MazEF, ParDE, Phd-Doc, RelBE et VapBC. Afin de classer les systèmes TA identifiés lors de l'analyse RASTA dans ces familles, leurs séquences protéiques ont été alignées en utilisant l'outil Guidance (Penn *et al.*, 2010), puis des arbres phylogénétiques ont été construits grâce à l'algorithme PhyML (Guindon & Gascuel, 2003), ce qui a permis d'éliminer les séquences phylogénétiquement divergentes. Chaque système TA a ensuite été annoté en fonction du domaine identifié par l'analyse RASTA.

C. Résultats

Nous avons trouvé 42 gènes de toxine-antitoxine chez *X. nematophila*, 12 chez *X. bovienii* SS-2004, 37 chez *X. doucetiae* et seulement 7 chez *X. poinarii* G6 (*Xp G6*) (Tableau 1). Plusieurs familles TA, notamment *mazEF*, *vapBC* et *phd-doc*, sont ainsi absentes de la souche *Xp G6*, alors qu'ils sont présents en plusieurs exemplaires dans l'espèce phylogénétiquement proche *X. doucetiae* (Tableau 1). *X. bovienii* SS-2004 contient également un nombre plus faible de loci TA, mais on y retrouve néanmoins *phd-doc* et *mazEF*. Ces deux systèmes sont impliqués dans le maintien de régions génomiques (Hazan *et al.*, 2001; Lehnher *et al.*, 1993). MazEF et VapBC sont également impliqués dans la formation de cellules persistantes (Wang & Wood, 2011; Ren *et al.*, 2012; Audoly *et al.*, 2011). De plus, chez *Xp G6*, aucun couple TA n'est composé de gènes possédant des domaines concordants. Nous avons ainsi pu trouver trois toxines (*higB*, *parE* et *relE*) dont le partenaire antitoxine putatif ne possédait pas de domaine identifiable. Les séquences des antitoxines ont ainsi pu diverger au cours de l'évolution de *Xp G6*.

D. Conclusion

Xp G6 possède peu de systèmes TA et aucun d'entre eux ne contient deux gènes aux domaines TA concordants, au contraire des autres espèces de *Xenorhabdus* étudiées. L'inventaire des systèmes TA de bactéries possédant des modes de vie différents a déjà montré que les bactéries vivant en association avec un hôte ne contiennent que peu de systèmes TA, au contraire des bactéries vivant librement (Pandey & Gerdes, 2005). *Xp G6* possède moins de régions de plasticité génomiques que les autres espèces de *Xenorhabdus*, et ne contient aucun locus *phd-doc* ou *mazEF*, impliqués dans le maintien d'îlots génomiques. Il est donc probable qu'au cours de sa réduction génomique, *Xp G6* ait perdu la majorité de ses loci TA lors de l'excision de régions génomiques. Les systèmes TA jouent un rôle dans la virulence de *Salmonella* ou d'*Haemophilus influenzae* (De la Cruz *et al.*, 2013; Ren *et al.*, 2012), probablement en permettant la formation de cellules persistantes capables de survivre au système immunitaire de l'hôte. Cependant, *Xp G6* ne contient aucun des loci dont l'implication dans la formation de cellules persistantes a été montrée. L'absence de tels loci pourrait causer une sensibilité particulière au système immunitaire de l'insecte chez *Xp G6*, ce qui expliquerait sa non-virulence par injection.

III- Conclusion du chapitre I

Les bactéries appartenant à l'espèce *X. poinarii* sont non-virulentes par injection directe dans les insectes. L'étude de la souche *Xp G6* a montré que de nombreux gènes, connus pour être impliqués dans la virulence de *Xenorhabdus*, étaient absents de son génome. *Xp G6* contient également un faible nombre de loci toxine-antitoxine, dont aucun ne semble jouer un rôle dans l'apparition de cellules persistantes. Ainsi, *Xp G6* pourrait être particulièrement sensible à la réaction immunitaire de l'insecte. Le nématode associé, *S. glaseri*, protège néanmoins *Xp G6* du système immunitaire de l'insecte grâce aux protéines situées sur sa cuticule externe, qui tuent les hémocytes et empêchent la phagocytose ainsi que l'action de l'immunité humorale (Li *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2012; Wang & Gaugler, 1999). Il existe donc une forte complémentarité de fonction entre *Xp G6* et *S. glaseri*.

Xp G6 possède un génome de taille réduite, caractéristique des souches de l'espèce *X. poinarii*. L'étude de ce génome montre des signes de réduction génomique, et notamment d'excision de fragments d'ADN de grande taille. La délétion de larges régions génomiques est en général le signe d'une rationalisation du génome bactérien, qui réduit le coût métabolique de la réplication dans un environnement stable (Giovannoni *et al.*, 2014). Néanmoins, le phénomène de dérive génétique peut également entraîner l'excision de larges fragments d'ADN dans les premiers stades de l'adaptation à un hôte (Moran & Mira, 2001). Dans le cas d'une symbiose obligatoire, une partie des compétences bactériennes peut être transférée à l'hôte (Moran *et al.*, 2008); ceci pourrait être le cas de la fonction de résistance au système immunitaire de l'insecte dans le cas de la symbiose *Xp G6-S. glaseri*.

Ainsi, la forte interaction entre *Xp G6* et son nématode se reflète sur son génome. L'étude des génomes de souches de *Xenorhabdus* montrant une complémentarité de fonctions avec *Steinernema* pourrait apporter des informations sur l'évolution des interactions *Xenorhabdus-Steinernema*, mais aussi de nouvelles données sur l'effet de la restriction d'hôte sur les génomes bactériens.

Chapitre 2. Caractérisation des interactions *Steinernema-Xenorhabdus bovienii*.

I- Introduction

L'interaction entre nématode et bactérie est plus ou moins forte selon l'association *Steinernema-Xenorhabdus*. Il est donc nécessaire de caractériser la pathogénicité de diverses associations *Steinernema-Xenorhabdus*, et en particulier, celles d'associations fortement complémentaires, dans lesquelles les partenaires individuellement pris sont non-virulents. Ceci permettrait de comprendre quelles fonctions sont assurées par chacun des deux partenaires lors de l'infection de l'insecte.

Ici, de telles associations ont été recherchées au sein de couples némato-bactériens mettant en jeu l'espèce *X. bovienii* (*Xb*). *Xb* est associée à au moins neuf espèces de *Steinernema* (Lee & Stock, 2010b), et ces associations ont été retrouvées en Europe, en Asie et en Amérique, dans différents insectes (Emelianoff *et al.*, 2008; Lee & Stock, 2010a; Mráček *et al.*, 2003; Nguyen *et al.*, 2008; Spiridonov *et al.*, 2004b; Tailliez *et al.*, 2006).

Peu d'études ont examiné la virulence individuelle de *Xb* et des *Steinernema* qui lui sont associés (Ehlers *et al.*, 1997; Chaston *et al.*, 2011; Sugar *et al.*, 2012), et aucune n'a mis en place de conditions standardisées pour évaluer leur pathogénicité. Nous avons donc mis en place une approche de comparaison de la virulence de différentes associations *Steinernema-Xb*, ainsi que des partenaires individuels, sur deux lépidoptères modèles, *Galleria mellonella* et *Spodoptera littoralis*. Les travaux de pathologie sur les couples némato-bactériens et sur les bactéries seules ont été publiés dans le *Journal of Invertebrate Pathology* (voir partie II). Les travaux permettant l'obtention des nématodes aposymbiotiques et l'étude de leur pathogénicité sont présentés dans la partie III de ce chapitre.

II- Efficacité du parasitisme par les associations *Steinernema sp.-Xb* et mesure de la virulence de la bactérie *Xb* seule

Ce paragraphe s'appuie sur l'article 2 : Gaëlle Bisch, Sylvie Pagès, John G. McMullen II, S. Patricia Stock, Bernard Duvic, Alain Givaudan, Sophie Gaudriault, « *Xenorhabdus bovienii* CS03, the bacterial symbiont of the entomopathogenic nematode *Steinernema weiseri*, is a non-virulent strain against lepidopteran insects ». *Journal of Invertebrate Pathology* (2014), Available online 12 October 2014, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2014.10.002>.

Dans cet article, nous avons évalué la virulence de plusieurs couples némato-bactériens *Steinernema sp.-Xb* ainsi que la virulence par injection des partenaires bactériens. Nous y décrivons la souche *Xb* CS03, qui est non-virulente par injection.



Xenorhabdus bovienii CS03, the bacterial symbiont of the entomopathogenic nematode *Steinernema weiseri*, is a non-virulent strain against lepidopteran insects



Gaëlle Bisch^{a,b}, Sylvie Pagès^{a,b}, John G. McMullen II^{c,d}, S. Patricia Stock^c, Bernard Duvic^{a,b}, Alain Givaudan^{a,b}, Sophie Gaudriault^{a,b,*}

^a Diversité, Génomes et Interactions Microorganismes-Insectes (DGIMI), Institut National de la Recherche Agronomique, 34095 Montpellier Cedex 05, France

^b Diversité, Génomes et Interactions Microorganismes-Insectes (DGIMI), Université Montpellier 2, 34095 Montpellier Cedex 05, France

^c Department of Entomology, University of Arizona, 1140 E. South Campus Dr., Tucson, AZ 85721-0036, United States

^d School of Animal and Comparative Biomedical Sciences, University of Arizona, 1117 E. Lowell St., Tucson, AZ 85721, United States

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 August 2014

Accepted 3 October 2014

Available online 12 October 2014

Keywords:

Xenorhabdus bovienii

Steinernema

Galleria mellonella

Spodoptera littoralis

Virulence

ABSTRACT

Xenorhabdus bacteria (γ -proteobacteria: Enterobacteriaceae) have dual lifestyles. They have a mutualistic relationship with *Steinernema* nematodes (Nematoda: Steinernematidae) and are pathogenic to a wide range of insects. Each *Steinernema* nematode associates with a specific *Xenorhabdus* species. However, a *Xenorhabdus* species can have multiple nematode hosts. For example, *Xenorhabdus bovienii* (Xb) colonizes at least nine *Steinernema* species from two different phylogenetic clades. The *Steinernema*–Xb partnership has been found in association with different insect hosts. Biological and molecular data on the *Steinernema jolietii*–Xb strain SS-2004 pair have recently been described. In particular, the Xb SS-2004 bacteria are virulent alone after direct injection into insect, making this strain a model for studying Xb virulence. In this study, we searched for Xb strains attenuated in virulence. For this purpose, we underwent infection assays with five *Steinernema* spp.–Xb pairs with two insects, *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) and *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). The *S. weiseri*–Xb CS03 pair showed attenuated virulence and lower fitness in *S. littoralis* in comparison to the other nematode–bacteria pairs. Furthermore, when injected alone into the hemolymph of *G. mellonella* or *S. littoralis*, the Xb CS03 bacterial strain was the only non-virulent strain. By comparison with the virulent Xb SS-2004 strain, Xb CS03 showed an increased sensitivity to the insect antimicrobial peptides, suggesting an attenuated response to the insect humoral immunity. To our current knowledge, Xb CS03 is the first non-virulent Xb strain identified. We propose this strain as a new model for studying the *Xenorhabdus* virulence.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Entomopathogenic nematodes of the genus *Steinernema* (Nematoda: Steinernematidae) have a mutualistic–symbiotic association with enteric *Xenorhabdus* (γ -proteobacteria: Enterobacteriaceae) (Thomas and Poinar, 1979). Together, the nematodes and their bacterial symbionts represent a potent virulent partnership, which is able to kill a wide range of insect pests (Gaugler, 2002; Kaya and Gaugler, 1993). When the nematodes penetrate into the insect hemocoel, they release *Xenorhabdus* bacteria. The bacteria kill the insect by septicemia and toxemia (Boemare, 2002). Once the

bacteria are established in the cadaver, they degrade the insect tissues, enabling nematode maturation and reproduction. After nutrient resources are depleted, the juvenile nematodes switch to the infective juvenile (IJ) stage, which reassociates with the bacteria, leaving the cadaver in search for a new host (Poinar, 1990; Goodrich-Blair and Clarke, 2007; Stock and Goodrich Blair, 2008).

Steinernema spp.–*Xenorhabdus* spp. pairs are tractable model systems that can be experimentally manipulated to study host–symbiont interactions (Goodrich-Blair and Clarke, 2007; Herbert and Goodrich-Blair, 2007). Under laboratory conditions the nematodes and the bacteria can be disassociated and evaluated for their individual pathogenic effects. For example, in the *Steinernema carpocapsae*–*Xenorhabdus nematophila* pairs, the partners have a facultative dependence to each other. Aposymbiotic (*i.e.* symbiont-free) *S. carpocapsae* nematodes are pathogenic to last instar larvae of the greater wax moth, *Galleria mellonella* (Lepidoptera:

* Corresponding author at: INRA, UMR Diversité, Génomes et Interactions Microorganismes-Insectes (DGIMI), Université Montpellier 2, CC 54, 34095 Montpellier Cedex 05, France. Fax: +33 4 67 14 42 99.

E-mail address: sgaudriault@univ-montp2.fr (S. Gaudriault).

Pylalidae). However, nematode reproduction is reduced in the absence of the bacterial symbionts (Han and Ehlers, 2000; Simões et al., 2000). *X. nematophila* bacteria alone are highly pathogenic when directly injected into the hemocoel of insect hosts (Poinar and Thomas, 1966; Sicard et al., 2004). An outstanding characteristic of *X. nematophila* is its ability to counteract the insect immune system (Goodrich-Blair and Clarke, 2007; Nielsen-LeRoux et al., 2012). For example, this species produces an array of cytolytic/hemolysins and toxins, which target hemocytes, the key elements of cellular immune responses including phagocytosis, nodulation and encapsulation (Hinchliffe et al., 2010; Lanois et al., 2008; Vigneux et al., 2007). *X. nematophila* also counteracts two features of the insect humoral immune system. First, *X. nematophila* produces metabolites that block the insect phenoloxidase responsible for melanin deposition directly on intruding organism (Crawford et al., 2012; Song et al., 2011). Furthermore, *X. nematophila*, which is sensitive to insect antimicrobial peptides (AMP), destroys hemolymph antimicrobial activity via the production of proteases (Caldas et al., 2002) or inhibits *in vivo* the expression of some AMP (Duvic et al., 2012; Ji and Kim, 2004). Contrarily to the *S. carpocapsae* – *X. nematophila* association, in the *Steinernema glaseri*–*Xenorhabdus poinarii* pair, both the bacteria and the nematode partners are weakly virulent or completely lose their virulence to an insect host when they are experimentally disassociated (Akhurst, 1986; Ogier et al., 2014). To date, this pair is the only documented example where the bacterial symbionts are non-virulent. Finding other non-virulent *Xenorhabdus* strains would help to gain a better understanding of the bacterial virulence process leading to death of the insect hosts.

One interesting *Xenorhabdus* species is *Xenorhabdus bovienii* (Xb), which associates with multiple *Steinernema* found in different insect hosts in Europe, Asia and the Americas (Emelianoff et al., 2008; Lee and Stock, 2010a; Mráček et al., 2003; Nguyen et al., 2008; Spiridonov et al., 2004; Tailliez et al., 2006). At present, Xb bacterial strains have been reported to be hosted by at least nine *Steinernema* species from two phylogenetic sub-clades, the “*feltiae*” and the “*affine*” clades (Lee and Stock, 2010b). Several studies have examined the virulence and host range of *Steinernema* spp.–Xb pairs (Bélair and Boivin, 1985; Fuxa et al., 1988; Georgis et al., 1987; Morton and Del Pino, 2008; Thurston and Yule, 1990). However, few studies have assessed the virulence of each partner alone. For example, Ehlers et al. (1997) showed that *S. feltiae* strain NLS-OBSIII (“*feltiae*” clade) and its Xb symbiont remain virulent when they are disassociated and injected separately into *G. mellonella* larvae. In another study, Sugar et al. (2012) demonstrated that Xb SS-2004, the symbiont of *Steinernema jolietii* (“*feltiae*” clade), is virulent to *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae) fourth instar larvae when injected into the hemocoel. Following genomic and genetic studies, Xb SS-2004 has recently become an additional model for studying interactions between *Xenorhabdus* and its invertebrate hosts (Chaston et al., 2011; Sugar et al., 2012). Comparison of pathology data from these studies is difficult, due to the differences in experimental design including insect hosts and inocula considered. Therefore, in this study we considered a comparative approach to assess the virulence of a selection of *Steinernema* sp.–Xb pairs, and Xb strains alone, on two insect models for pathology studies *G. mellonella* and *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae).

2. Materials and methods

2.1. Bacteria, nematodes and growth conditions

The five considered pairs of *Steinernema* spp.–Xb are members of the “*feltiae*” clade in the *Steinernema* species (Lee and Stock,

2010b). Species and strain designation, geographic origin and source are listed in Table 1. Bacterial isolates were obtained from IJ nematodes by the hanging drop technique (Poinar, 1966), except that IJ were disinfected in a sodium hypochlorite solution (10%) for 10 min to remove any surface contaminants. *Xenorhabdus* were routinely grown at 28 °C in Luria–Bertani (LB) broth, on nutrient agar (Difco) plates or nutrient bromothymol blue agar (NBTA) plates (Boemare et al., 1997). The bacteria were stored at –80 °C with 16% glycerol (v/v). Fresh nematode stocks were generated monthly (pathogenicity assays) or every six months (laboratory collection) by infestation of last instar of *G. mellonella* or sixth instar of *S. littoralis* larvae (see below). Nematode strains were stored at 8 °C in Ringer’s solution (Merck).

2.2. Insect rearing

S. littoralis larvae were reared on an artificial diet (Poitout and Buès, 1970) at 23 ± 1 °C, with a photoperiod of L16:D8 and RH 40 ± 5%. *G. mellonella* larvae were reared at 28 °C in dark with honey and pollen.

2.3. Insect infection assays

Experiments were performed on last instar of *G. mellonella* or sixth instar (one-day-old) of *S. littoralis* larvae. Pathogenicity assays were performed at 23 °C, unless otherwise specified.

2.3.1. Assays with nematode–bacteria pairs

Two parameters were measured following infestation with nematode–bacteria pairs, the virulence and the fitness. *S. littoralis* or *G. mellonella* larvae were placed into punctured microcentrifuge tubes containing Whatman filter paper inoculated with 100 IJ nematodes, naturally colonized by their *Xenorhabdus* symbionts. The tubes were incubated in the dark at 23 °C. Virulence of *Steinernema* spp.–Xb pairs was monitored for 7 days post-infestation as proportion of insect mortality. Dead larvae were placed on individual White traps (White 1927) and two parameters were evaluated in order to assess the fitness of the *Steinernema* spp.–Xb pairs: (i) the parasitic success (proportion of cadavers from which a nematode offspring emerges) and (ii) the reproductive rate (number of IJ nematodes emerging from an insect larva) (Sicard et al., 2003). These parameters were assessed 10, 20 and 30 days after the insect death. Three independent experiments were done with ten replicates (insect larvae) each. Statistical tests were performed on R software (R Core Team, 2013). Statistically significant differences in insect mortality and parasitic success were assessed using Cox proportional hazard models (Therneau and Grambsch, 2000; Therneau, 2013) using the *S. weiseri*–Xb CS03 pair as reference. Reproductive rate was found to deviate from normality (Shapiro–Wilk normality test on residuals, $W = 0.9173$; $p = 2.295 \times 10^{-7}$ for *S. littoralis* and $W = 0.9502$; $p = 1.614 \times 10^{-4}$ for *G. mellonella*). We therefore used a Kruskal–Wallis test to define groups with similar reproductive rate (Giraudeau, 2013).

2.3.2. Assays with bacteria alone

In vivo insect pathogenicity assays with *Xenorhabdus* strains were performed as previously described (Givaudan and Lanois, 2000). Briefly, *Xenorhabdus* were grown in LB broth to an $OD_{540} \sim 0.8$, washed and diluted in phosphate-buffer saline. The insects were injected with 20 µL of the appropriate dilution. The number of injected bacterial cells was evaluated by plating on nutrient agar and cfu counting. Pathogenicity assay for each virulent *Xenorhabdus* strain was done twice. For the non-virulent CS03 strains, repetition of an experiment was done at least ten times using *X. nematophila* or *X. bovienii* SS-2004 as control of virulence. After injection, *S. littoralis* larvae were incubated at 23 °C

Table 1List of *Steinernema* sp. nematodes and their *Xenorhabdus bovienii* (Xb) bacterial symbionts used in this study.

Nematode species	Xb symbiont	Geographical origin	Nematode references	Xb references
<i>S. cholashanense</i>	TB10	Tibet	Nguyen et al. (2008)	Tailliez et al. (2006)
<i>S. feltiae</i>	FR44	France	Emelianoff et al. (2008)	This study
<i>S. jolietii</i>	SS-2004	Missouri, USA	Spiridonov et al. (2004)	Chaston et al. (2011)
<i>S. weiseri</i>	CS03	Czech Republic	Mráček et al. (2003)	Tailliez et al. (2006)
<i>S. weiseri</i>	CS04	Czech Republic	Mráček et al. (2003)	this study
<i>S. weiseri</i>	CS05	Czech Republic	Mráček et al. (2003)	This study
<i>S. weiseri</i>	CS07	Czech Republic	Mráček et al. (2003)	This study
<i>S. weiseri</i>	TR03	Turkey	Mráček et al. (2003)	This study

whereas *G. mellonella* larvae were incubated at 28 °C. Bacterial virulence was monitored for 50 h and assessed as percentage of dead insect larvae. The time for killing 50% of the insect larvae (LT₅₀) was also calculated. Statistically significant differences in insect mortality were assessed using Cox proportional hazard models (Therneau and Grambsch, 2000; Therneau, 2013) using the Xb CS03 strain as reference.

2.4. *Xenorhabdus* colonization of *S. littoralis*

To assess the ability of Xb SS2004 and Xb CS03 to colonize *S. littoralis* larvae without their nematode partner, we monitored the bacterial growth *in vivo* in *S. littoralis* larvae or *ex-vivo* in hemolymph drawn from *S. littoralis* larvae. In a preliminary test, we checked that *in vitro* growth of Xb CS03 and Xb SS-2004 was similar, by inoculating LB broth with overnight bacterial cultures (1:1000) and by measuring with an Infinite M200 microplate reader (Tecan) the absorbance at 600 nm of bacterial cultures every 30 min (shaking, 28 °C).

2.4.1. *In vivo* growth in *S. littoralis* insect larvae

Bacteria were grown overnight to late stationary phase (OD₅₄₀ ~ 3) in LB broth. An inoculum of about 10⁴ colony forming units (cfu) was injected into sixth instar *S. littoralis* larvae. Bacterial multiplication into the insect was measured at 0, 3, 7, 24, 32 and 48 h after the injection. For each time, eight insects were sterilized with 70% (v/v) ethanol and crushed in presence of 3 mL of LB broth using the Tissue-Lyzer II (vibration frequency 30 Hz, 1 min). Serial dilutions of the homogenate were plated on NBTA containing erythromycin (15 µg/mL) and cfu were counted after incubation (48 h, 28 °C). The results were expressed as number of cfu per insect.

2.4.2. *Ex vivo* growth in hemolymph

Hemolymph (1.5 mL) was collected from three-day-old sixth instar larvae of *S. littoralis* and inoculated with 10⁷ bacteria. After 0, 5 and 24 h of incubation in the hemolymph at 28 °C with agitation, number of cfu was measured by plating serial dilutions on nutrient agar plates.

2.5. Antimicrobial peptide resistance assay

To evaluate the susceptibility of Xb strains to antimicrobial peptides (AMP), key elements of the insect humoral immune response, we monitored the minimal inhibition concentration (MIC) of colistin, polymyxin B, cecropin A and Sf-Cec B, on Xb SS2004 and Xb CS03 as previously described in Abi Khattar et al. (2009).

2.6. Phenoloxidase inhibition assay

To evaluate the ability of Xb SS2004 and Xb CS03 to counteract the activity of insect phenoloxidase, we modified the protocol described by Cherqui et al. (1996). Xb SS-2004 and Xb CS03 were

grown overnight in 50 mL LB broth in Erlenmeyer flasks. Bacteria were pelleted by centrifugation (13,000 rpm, 3 min) and the supernatant was filtered (0.2 µm) before use. Hemocyte lysate supernatants (HLS) were obtained from *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acrididae). Laminarin (20 µL, 1 mg/mL, Sigma) and CaCl₂ (10 µL, 70 mM) were used to activate the phenoloxidase contained in 20 µL aliquots of HLS, except in the unactivated control in which we omitted the laminarin. After 10 min incubation at room temperature, 20 µL of bacterial culture supernatant were added. An activated phenoloxidase control was made by replacing the bacterial supernatant by LB broth. After an additional 20 min-incubation at room temperature, one mL of L-Dopa (4 g/L, Sigma) was added. The activity of phenoloxidase was expressed as the change in absorbance at 490 nm to the quantity of HLS proteins. Statistical differences were assessed on (R Core Team, 2013) using a Kruskal–Wallis test (Giraudoux, 2013).

3. Results

3.1. Efficiency of parasitism by *Steinernema* sp.–*X. bovienii* pairs is variable

Virulence of *Steinernema*–Xb varied depending on the pairs considered. In *G. mellonella*, we observed 100% of mortality for the five tested pairs at 3 days post infection (Fig. 1A), although *S. weiseri*–Xb CS03 and *S. cholashanense*–Xb TB10 caused a slightly delayed mortality of the larvae ($\chi^2 > 3.841$, $df = 1$, $p < 0.05$). High mortality rates were also observed in *S. littoralis* at 3 days post infection for the *S. feltiae*–Xb FR44, *S. weiseri*–Xb TR03, *S. cholashanense*–Xb TB10 and *S. jolietii*–Xb SS-2004 pairs (Fig. 1D). By contrast, only 15% of the *S. littoralis* larvae infested with *S. weiseri*–Xb CS03 pair were dead at this time ($\chi^2 > 3.841$, $df = 1$, $p < 0.05$).

Fitness, assessed as the parasitic success and the reproductive rate, was also variable. For the 30 days of the experiment, parasitic success of *S. weiseri*–Xb CS03 and *S. jolietii*–Xb SS-2004 in *G. mellonella* was lower than the one of the other *Steinernema*–Xb pairs tested (Fig. 1B, $\chi^2 > 3.841$, $df = 1$, $p < 0.05$). In *S. littoralis*, all nematode–bacteria pairs but *S. weiseri*–Xb CS03 showed 90–100% of parasitic success as soon as 10 days after death (Fig. 1E). The *S. weiseri*–Xb CS03 pair showed a slightly lower parasitic success 30 days after the infestation ($\chi^2 > 3.841$, $df = 1$, $p < 0.05$). When examining the reproductive rate, we defined two distinct groups regardless of the infected insect (Fig. 1C and F). *S. weiseri*–Xb TR03, *S. cholashanense*–Xb TB10 and *S. feltiae*–Xb FR44 had a high reproductive rate with an average progeny production of ~75,000–1,00,000 IJ/insect in *G. mellonella* larvae and 42,000–78,000 IJ/insect in *S. littoralis* larvae. By comparison, *S. jolietii*–Xb SS-2004 and *S. weiseri*–Xb CS03 had a significantly lower reproductive rate in *G. mellonella* ($\chi^2 > 9.88$, $df = 4$, $p = 0.05$) and in *S. littoralis* ($\chi^2 > 9.88$, $df = 4$, $p = 0.05$) (Fig. 1C and F).

Altogether, these data suggest that the pathogenicity of the *S. weiseri*–Xb CS03 pair is lower than the one observed in the four other *Steinernema*–Xb pairs.

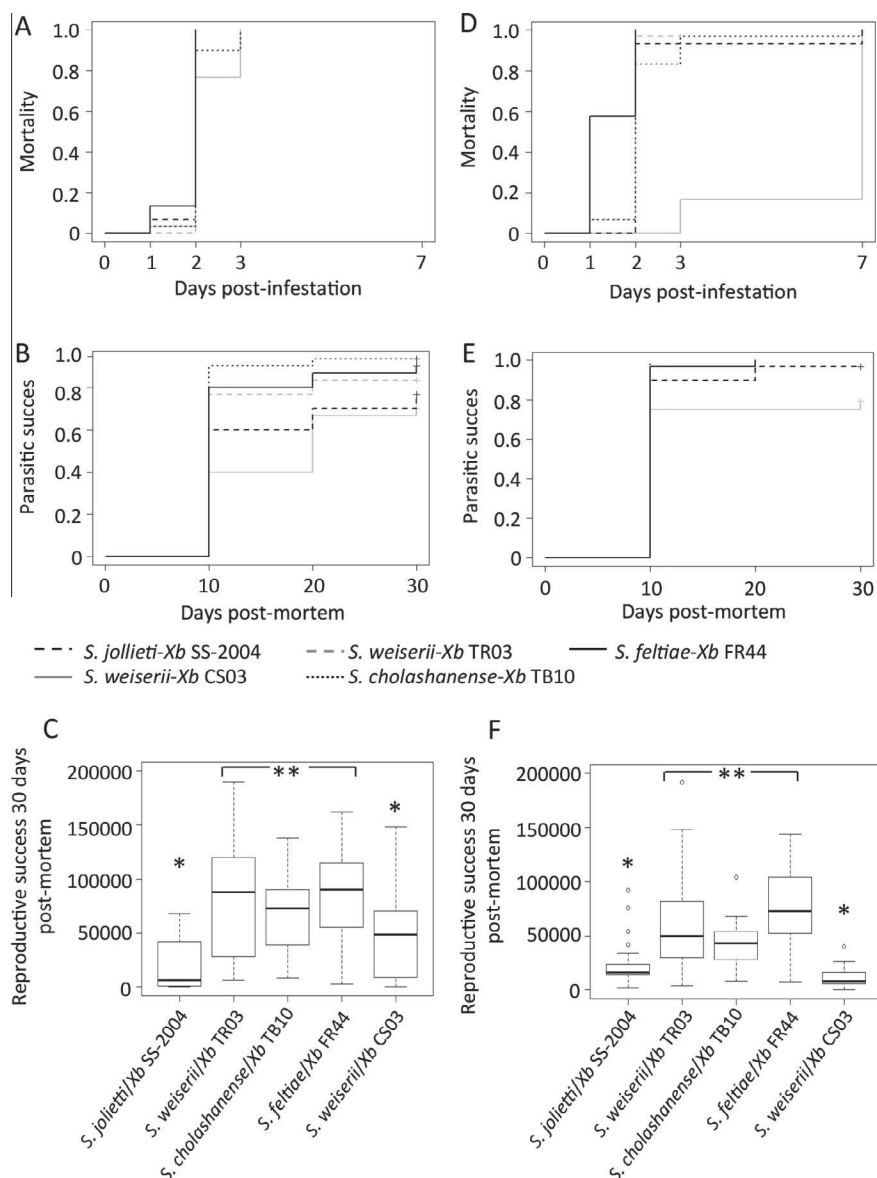


Fig. 1. Infection of *Galleria mellonella* and *Spodoptera littoralis* larvae by different *Steinernema*-Xb pairs. Graph represents the results for 30 larvae from 3 independent experiments (10 insect larvae per experiment were infested with 100 IJ/insect). (A) Proportion of mortality of *G. mellonella* after infestation by different *Steinernema*-Xb pairs. (B) Parasitic success of different *Steinernema*-Xb pairs on *G. mellonella*. Parasitic success is expressed as the ratio between the number of larvae with IJ emergence and the number of dead larvae. (C) Reproductive rate of the *Steinernema*-Xb pairs on *G. mellonella* expressed as the total number of IJs emerging from a dead insect 30 days after death. Results are given as box plots, where the horizontal line indicates the median, the box the first quartile of the data above and below the median, the whiskers the range of the data and the dots the outlier values. A different number of stars indicates a statistically significant difference (Kruskal-Wallis test, $p < 0.05$). (D) Proportion of mortality of *S. littoralis* after infestation by different *Steinernema*-Xb pairs. (E) Parasitic success of different *Steinernema*-Xb pairs on *S. littoralis*. Parasitic success is expressed as the ratio between the number of larvae with IJ emergence and the number of dead larvae. (F) Reproductive rate of the *Steinernema*-Xb pairs on *S. littoralis* expressed as the total number of IJs emerging from a dead insect 30 days after death. For representation legend, see (C).

3.2. Xb CS03 is not virulent after injection into *S. littoralis* and *G. mellonella*

Injection of 10^3 cfu of Xb FR44, Xb TB10, Xb TR03 and Xb SS-2004 killed *G. mellonella* (LT₅₀: 11–38 h) and *S. littoralis* (LT₅₀: 20–25 h) (Fig. 2A and B). Contrarily, Xb CS03 was completely non-virulent at this dose ($\chi^2 > 3.841$, $df = 1$, $p < 0.05$). To verify that the non-virulence of Xb CS03 was not due to laboratory domestication, the bacterial symbiont was re-isolated from a stock of our *S. weiseri* laboratory collection sixteen months (isolates CS04 and CS05) and 5 years (isolate CS07) after the CS03 isolation (Table 1). The 16S DNA sequence was identical to Xb CS03 16S DNA sequence previously described (Tailliez et al., 2006). Xb CS04, Xb CS05 and

Xb CS07 also showed to be non-virulent at a concentration of 10^3 cfu when injected in *S. littoralis* (Fig. 2C).

Additionally, we tested the virulence of Xb CS03 at a higher concentration. At 10^4 cfu per insect, this strain was not virulent to *S. littoralis*. To reach the same mortality rates of *S. littoralis* as those observed for the other Xb strains (100% of mortality 20–30 h post injection), the injection of 10^6 cfu was required (Fig. 2D).

3.3. Xb CS03 is unable to colonize *S. littoralis* larvae without its nematode partner

As shown in the injection assays, Xb SS-2004 killed 100% of the insects, whereas Xb CS03 did not cause insect mortality (Fig. 2B

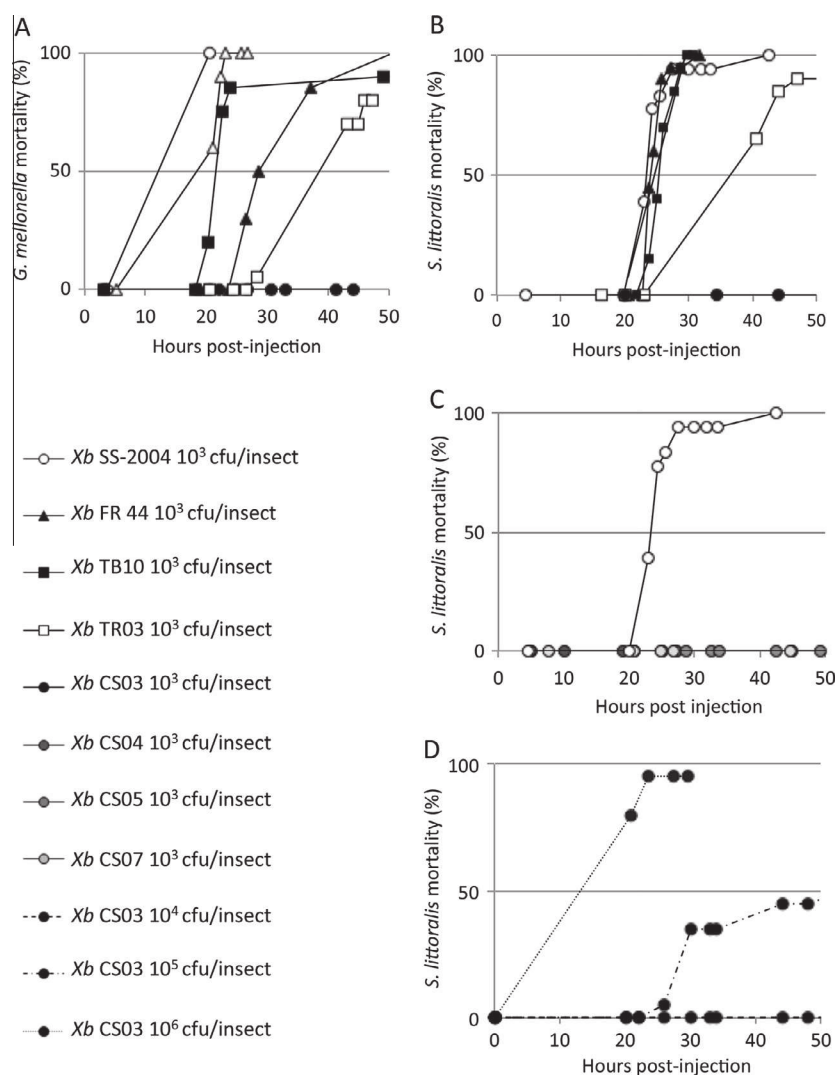


Fig. 2. Comparison of bacterial strains virulence tested by intra-hemocoelic injection in *Galleria mellonella* or *Spodoptera littoralis* larvae. The mortality curves are representative of at least 2 experiments (twice for each virulent *Xenorhabdus* strain and at least ten times for the non-virulent CS03 strain). For each bacterial strain, 1000 bacteria in 20 μ L of LB media were inoculated into 20 insects. After infection, the insects were incubated at 28 °C (*G. mellonella*) or 23 °C (*S. littoralis*). (A) Mortality of *G. mellonella* following injection of a dose of 10^3 cfu of the five *Xb* bacterial strains. (B) Mortality of *S. littoralis* following injection of a dose of 10^3 cfu of the five *Xb* bacterial strains. (C) Mortality of *S. littoralis* following injection of a dose of 10^3 cfu of the *Xb* CS04, *Xb* CS05 and *Xb* CS07 strains isolated from *S. weiseri* 583. (D) Mortality of *S. littoralis* following injection of a dose of 10^4 , 10^5 or 10^6 cfu of *Xb* CS03.

and mortality curve in Fig. 3). Similar to the growth pattern of *X. nematophila* after the injection of 10^4 cfu (Sicard et al., 2004), *Xb* SS-2004 did not exhibit a reduction of cfu, and was able to grow and reach a concentration of 10^9 cfu per insect at 24 h post-injection. By contrast, at this time, *Xb* CS03 showed a clear decrease of cfu (i.e. bacterial clearance). The initial concentration of cfu was reached again 48 h after injection (Fig. 3), indicating a late and limited growth of *Xb* CS03 in hemolymph. We also tested if *Xb* CS03 was able to grow *ex vivo* in *S. littoralis* hemolymph. At an inoculum of 10^7 cfu per mL of hemolymph, *Xb* CS03 and *Xb* SS-2004 grew similarly and reached 10^8 cfu per mL at 24 h after inoculation (data not shown).

3.4. *Xb* CS03 is sensitive to the insect humoral immunity

We compared the ability of *Xb* CS03 and *Xb* SS-2004 culture supernatants to inhibit phenoloxidase activity, as it was previously described for *X. nematophila* (Crawford et al., 2012). Although *Xb* CS03 supernatants showed a slightly lower inhibition ability than *Xb* SS-2004 supernatants, this difference was not statistically

significant (Fig. 4). We also evaluated the *in vitro* resistance of *Xb* CS03 and *Xb* SS-2004 towards AMPs. For each AMP treatment, *Xb* SS-2004 displayed MIC 4–1000 times more elevated than *Xb* CS03 (Table 2). Altogether, these observations suggest that *Xb* CS03 has an attenuated response to the insect humoral immunity when compared with the virulent *Xb* SS-2004 strain.

4. Discussion

To our knowledge, this study is the first to assess, in a comparative manner, the pathogenicity of (i) *Steinernema* sp. nematodes from the phylogenetic «*feltiae*» clade, and (ii) their *Xb* bacterial symbionts. Infection assays in this study considering two Lepidoptera insects, *S. littoralis* and *G. mellonella* revealed two features. First, the *S. weiseri*–*Xb* CS03 pair displayed an attenuated virulence and exhibited a low fitness when compared with four other *Steinernema* sp.–*Xb* pairs. Second, injection assays showed that *Xb* CS03 strain is the only non-virulent strain from all tested *Xb* symbionts.

The *S. weiseri*–*Xb* CS03 pair was originally isolated in the Czech Republic using a *Galleria* bait trap, and its natural host remains

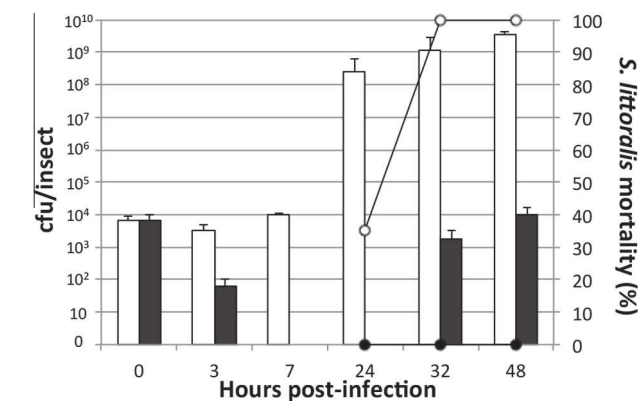


Fig. 3. Bacterial growth and insect larval mortality following the injection Xb SS-2004 (white) and Xb CS03 (black) into *Spodoptera littoralis*. The histogram shows the mean numbers of cfu recovered from crushed larvae (eight larvae per time point). Larvae were each injected with 10^4 bacteria at time zero. Error bars indicate standard errors of the means. Curves indicate mortality rates of larvae (a total of 20 larvae for each treatment) after the injection of 10^4 bacteria at time zero (*S. jolietii*-Xb SS-2004: open circles; *S. weiseri*-Xb CS03: closed circles).

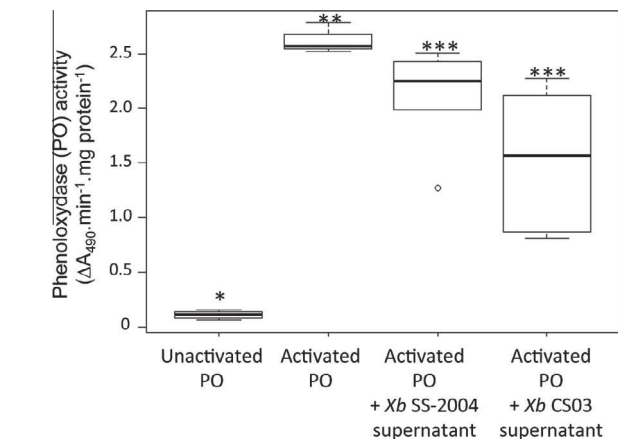


Fig. 4. Phenoloxidase inhibition by supernatants of Xb SS-2004 and Xb CS03. Phenoloxidase specific activity is expressed as the absorbance variation in function of time and protein quantity in the hemocytes lysate supernatant ($\Delta A_{490} \text{ min}^{-1} - \text{mg protein}^{-1}$). The “unactivated phenoloxidase” sample has not been activated with laminarin and the “activated phenoloxidase” sample has not been in contact with bacterial supernatant. Results are given as box plots, where the horizontal line indicates the median, the box the first quartile of the data above and below the median, the whiskers the range of the data and the dots the outlier values. Graph represents the data for 3 independent experiments. A different number of stars indicates a statistically significant difference (Kruskall–Wallis test, $p < 0.05$).

Table 2
Comparative *in vitro* susceptibility of *Xenorhabdus bovienii* strains SS-2004 (Xb SS-2004) and *Xenorhabdus bovienii* CS03 (Xb CS03) to antimicrobial peptides.^a

	Xb SS-2004	Xb CS03
Colistin (polymyxin E)	10 mg/mL	0.01 mg/mL
Polymyxin B	25 µg/mL	0.05 µg/mL
Cecropin A	25 µg/mL	6.25 µg/mL
Cecropin B (from <i>S. frugiperda</i>)	50 µg/mL	1.5 µg/mL

^a As determined by the broth dilution method. MICs were scored after 48 h of incubation at 28 °C. Results presented are representative of 2 or 3 independent experiments.

unknown (Mráček et al., 2003). The attenuated pathogenicity of the *S. weiseri*-Xb CS03 pair may therefore be explained by having narrow host specificity. Previous studies have shown that another *Steinernema*-*Xenorhabdus* pair, *S. glaseri*-*X. poinarii*, showed specificity and high virulence to only a few coleopteran species

(Converse and Grewal, 1998; Fallon et al., 2006; Rosa et al., 2002; Wang et al., 1995). In nature, it may be possible that *S. weiseri*-Xb CS03 also benefits from the interaction with another nematode-bacteria association. In this respect, Půža and Mráček (2009) showed that *Steinernema affine* has an enhanced reproduction in the presence of *Steinernema kraussei* under low inoculation rates. Alternatively, the *S. weiseri*-Xb CS03 association could only infest insect cadavers (San-Blas and Gowen, 2008). Further studies on the *S. weiseri*-Xb CS03 association including host spectrum analyses and competitive studies should help in testing these different hypotheses.

According to Bucher’s definition (Bucher, 1960, 1973), a bacterium is considered entomopathogenic when it is able to kill an insect host at a dose smaller than 10^5 cells. In this respect, four of the studied Xb strains, Xb FR44, Xb TR03, Xb TB10 and Xb SS-2004 are entomopathogenic as they kill *G. mellonella* and *S. littoralis* at a dose of 10^3 cfu. Contrarily, Xb CS03 caused no mortality in *G. mellonella* and *S. littoralis* with an injection dose of 10^3 cfu. A 100% of mortality was only achieved in *S. littoralis* at a concentration of 10^5 cfu. We and others previously described non-virulent *X. poinarii* strains on *S. littoralis* that cause attenuated mortality on *G. mellonella* (Akhurst, 1986; Ogier et al., 2014). This virulence default is not characteristic of a single *X. poinarii* strain but a feature of the bacterial species (Ogier et al., 2014). Contrarily, into the Xb species, Xb CS03 is the first non-virulent strain described at least for the two lepidopteran insects tested in this study. Furthermore, ongoing studies suggest that Xb CS03 does not cause mortality to *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and to *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acrididae) after injection of a dose of 10^4 cfu (Sylvie Pagès, unpublished data). Testing the Xb CS03 virulence on a larger range of insects will definitely expand characterization of Xb CS03 virulence.

Our study showed that Xb CS03 strain has a late limited growth in *S. littoralis* hemolymph, but is unable to cause septicemia in *S. littoralis*, when compared to two virulent strains Xb SS-2004 (our data) and *X. nematophila* F1 (Sicard et al., 2004). Hemolymph is the only extracellular fluid of an insect and constitutes the growth medium for the *Xenorhabdus* bacteria after they are released from the IJ into the insect’s body cavity. Hemolymph composition shares common features such as the replacement of the inorganic osmolar effectors by organic molecules and a little amount of fermentable sugars, but a high concentration of trehalose (Florkin and Jeuniaux, 1964). Nevertheless, a part of the hemolymph composition varies among different insect orders. For example, in Lepidoptera, hemolymph has a high proportion of free amino acids and few inorganic ions (Sutcliffe, 1963). Therefore, it can be hypothesized that metabolic deficiencies account for the lack of growth and septicemic effect of Xb CS03 in *S. littoralis*. However, when hemolymph drawn from *S. littoralis* was used as a bacterial culture broth, the non-virulent strain Xb CS03 and the virulent strain Xb SS-2004 did not display difference of growth.

We then made the assumption that Xb CS03 may be deficient to counteract the insect immune response. It was previously shown that culture supernatants from stationary phase of *X. nematophila* F1 and *X. bovienii* F3 displayed cytolytic activity against hemocytes from the hemolymph of *S. littoralis* (Brillard et al., 2001). In the same conditions, culture supernatants of Xb SS-2004 and Xb CS03 are also cytolytic (data not shown), suggesting that the virulence difference between the two Xb strains does not rely on deficiency in immunosuppressive strategies toward cellular insect immune response. It has been also demonstrated that virulent *X. nematophila* is able to immunosuppress phenoloxidase activity (Crawford et al., 2012; Song et al., 2011), which is responsible for the melanization of the bacterial cells, the production of cytotoxic products and the encapsulation of microorganisms (Cerenius et al., 2008). However, our data showed no clear difference between the

culture supernatants of the non-virulent strain *Xb* CS03 and of the virulent strain *Xb* SS-2004 in the inhibitory effect on phenoloxidase. Therefore, *Xb* CS03 does not differ from *Xb* SS-2004 in production of the immunosuppressive factors against phenoloxidase such as the rhabduscin and the benzylideneacetone (Crawford et al., 2012; Song et al., 2011). Interestingly, our data also showed that *Xb* CS03 strain was very sensitive to cationic AMPs, which are produced in large amounts in the insect hemolymph by the fat body and participate in antimicrobial defense (Lemaitre and Hoffmann, 2007). The virulent species *X. nematophila* is also sensitive to cecropin under *in vitro* assays (Duvic et al., 2012), but it inhibits *in vivo* the expression of cecropin in *Spodoptera* (Duvic et al., 2012; Ji and Kim, 2004). In this respect, we hypothesize that *Xb* CS03 may be deficient in immunosuppressive strategies toward AMPs. Since the *S. weiseri*–*Xb* CS03 pair successfully multiplies in insects, the *S. weiseri* nematode may play a role in AMP resistance. It has been shown that in *Drosophila melanogaster* and in *Spodoptera exigua*, AMP secretion peaks appear 3–6 h after the immune challenge (Bang et al., 2012; Lemaitre et al., 1997). Therefore, we speculate that during the natural infestation of an insect by the *S. weiseri*–*Xb* CS03 pair, the nematodes release their bacteria after this AMP secretion peak. This would explain the delayed mortality of *S. littoralis* caused by this nematode–bacterium pair. The *S. weiseri* nematode may also directly prevent the AMP action, as already described for a *S. feltiae* strain, which prevents the AMP action (Brivio et al., 2006).

In conclusion, results from this study highly suggest that *S. weiseri* and *Xb* CS03 are in a tight interaction, where the nematode likely assumes certain virulence functions, contrarily to the other *Steinernema*–*Xb* associations where the bacteria are virulent on their own. We propose the *Xb* CS03 bacterial strain, in comparison with its companion model *Xb* SS-2004, as a new model for the study of *Xenorhabdus* virulence and for the association with symbiotic *Steinernema* nematodes.

Acknowledgments

We thank Zdeněk Mráček and Vladimír Půža for the donation of the two *Steinernema weiseri* strains. We thank Patrick Tailliez for his help in choosing the nematode strains used in this study. We thank Nadège Ginibre for technical assistance with insect pathology assays.

We are grateful to the experimental facility PIQ for hosting our experiments on quarantine insect species in accordance with the 2008/61/CE European directive.

References

- Abi Khattar, Z., Rejasse, A., Destoumieux-Garzón, D., Escoubas, J.M., Sanchis, V., Lereclus, D., Givaudan, A., Kallassy, M., Nielsen-Leroux, C., Gaudriault, S., 2009. The *dlt* operon of *Bacillus cereus* is required for resistance to cationic antimicrobial peptides and for virulence in insects. *J. Bacteriol.* 191, 7063–7073. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.00892-09>.
- Akhurst, R.J., 1986. *Xenorhabdus nematophilus* subsp. *poinarii* – its interaction with insect pathogenic nematodes. *Syst. Appl. Microbiol.* 8, 142–147.
- Bang, K., Park, S., Yoo, J.Y., Cho, S., 2012. Characterization and expression of attacin, an antibacterial protein-encoding gene, from the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). *Mol. Biol. Rep.* 39, 5151–5159. <http://dx.doi.org/10.1007/s11033-011-1311-3>.
- Bélair, G., Boivin, G., 1985. Susceptibility of the Carrot Weevil (Coleoptera: Curculionidae) to *Steinernema feltiae*, *S. bibeonis*, and *Heterorhabditis heliothidis*. *J. Nematol.* 17, 363–366.
- Boemare, N., 2002. Biology, taxonomy, and systematics of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. In: Gaugler, R. (Ed.), *Entomopathogenic Nematology*. CABI Publishing, Wallingford.
- Boemare, N., Thaler, J.O., Lanois, A., 1997. Simple bacteriological tests for phenotypic characterization of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* phase variants. *Symbiosis* 22, 167–175.
- Brillard, J., Ribeiro, C., Boemare, N., Brehélin, M., Givaudan, A., 2001. Two distinct hemolytic activities in *Xenorhabdus nematophila* are active against immunocompetent insect cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2515–2525. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.67.6.2515-2525.2001>.
- Brivio, M.F., Moro, M., Mastore, M., 2006. Down-regulation of antibacterial peptide synthesis in an insect model induced by the body-surface of an entomoparasite (*Steinernema feltiae*). *Dev. Comp. Immunol.* 30, 627–638. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2005.09.008>.
- Bucher, G.E., 1960. Potential bacterial pathogens of insects and their characteristics. *J. Insect Pathol.* 2, 172–195.
- Bucher, G.E., 1973. Definition and identification of insect pathogens. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 217, 8–17. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.1973.tb32744.x>.
- Caldas, C., Cherqui, A., Pereira, A., Simões, N., 2002. Purification and characterization of an extracellular protease from *Xenorhabdus nematophila* Involved in Insect Immunosuppression. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1297–1304. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.68.3.1297-1304.2002>.
- Cerenius, L., Lee, B.L., Söderhäll, K., 2008. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends Immunol.* 29, 263–271. <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2008.02.009>.
- Chaston, J.M., Suen, G., Tucker, S.L., Andersen, A.W., Bhasin, A., Bode, E., Bode, H.B., Brachmann, A.O., Cowles, C.E., Cowles, K.N., Darby, C., de Léon, L., Drace, K., Du, Z., Givaudan, A., Herbert Tran, E.E., Jewell, K.A., Knack, J.J., Krasomil-Osterfeld, K.C., Kukor, R., Lanois, A., Latreille, P., Leimgruber, N.K., Lipke, C.M., Liu, R., Lu, X., Martens, E.C., Marri, P.R., Médigue, C., Menard, M.L., Miller, N.M., Morales-Soto, N., Norton, S., Ogier, J.-C., Orchard, S.S., Park, D., Park, Y., Quorllo, B.A., Sugar, D.R., Richards, G.R., Rouy, Z., Slominski, B., Slominski, K., Snyder, H., Tjaden, B.C., van der Hoeven, R., Welch, R.D., Wheeler, C., Xiang, B., Barbazuk, B., Gaudriault, S., Goodner, B., Slater, S.C., Forst, S., Goldman, B.S., Goodrich-Blair, H., 2011. The entomopathogenic bacterial endosymbionts *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: convergent lifestyles from divergent genomes. *PLoS ONE* 6, e27909. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0027909>.
- Cherqui, A., Duvic, B., Brehélin, M., 1996. Purification and characterization of prophenoeloxidase from the haemolymph of *Locusta migratoria*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 32, 225–235. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6327\(1996\)32:2<225::AID-ARCH6>3.0.CO;2-X](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1520-6327(1996)32:2<225::AID-ARCH6>3.0.CO;2-X).
- Converse, V., Grewal, P.S., 1998. Virulence of entomopathogenic nematodes to the western masked chafer *Cyclocephala hirta* (Coleoptera: Scarabaeidae). *J. Econ. Entomol.* 91, 428–432.
- Crawford, J.M., Portmann, C., Zhang, X., Roefsaers, M.B.J., Clardy, J., 2012. Small molecule perimeter defense in entomopathogenic bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, doi:10.1073/pnas.1201160109.
- Duvic, B., Jouan, V., Essa, N., Girard, P.-A., Pagès, S., Abi Khattar, Z., Volkoff, N.-A., Givaudan, A., Destoumieux-Garzón, D., Escoubas, J.-M., 2012. Cecropins as a marker of *Spodoptera frugiperda* immunosuppression during entomopathogenic bacterial challenge. *J. Insect Physiol.* 58, 881–888. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2012.04.001>.
- Ehlers, R.U., Wulff, A., Peters, A., 1997. Pathogenicity of axenic *Steinernema feltiae*, *Xenorhabdus bovienii*, and the bacto-helminthic complex to larvae of *Tipula oleracea* (Diptera) and *Galleria mellonella* (Lepidoptera). *J. Invertebr. Pathol.* 69, 212–217. <http://dx.doi.org/10.1006/jip.1996.4647>.
- Emelianoff, V., Le Brun, N., Pagès, S., Stock, S.P., Tailliez, P., Moulia, C., Sicard, M., 2008. Isolation and identification of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria from Héroult and Gard (Southern France). *J. Invertebr. Pathol.* 98, 211–217. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2008.01.006>.
- Fallon, D.J., Solter, L.F., Bauer, L.S., Miller, D.L., Cate, J.R., McManus, M.L., 2006. Effect of entomopathogenic nematodes on *Plectrodera scalator* (Fabricius) (Coleoptera: Cerambycidae). *J. Invertebr. Pathol.* 92, 55–57. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2006.01.006>.
- Florkin, M., Jeuniaux, C., 1964. Hemolymph: composition. In: Rockstein, M. (Ed.), *The Physiology of Insecta*. Academic Press, New York, London, pp. 109–149.
- Fuxa, J.R., Richter, A.R., Acudelo-Silva, F., 1988. Effect of host age and nematode strain on susceptibility of *Spodoptera frugiperda* to *Steinernema feltiae*. *J. Nematol.* 20, 91–95.
- Gaugler, R., 2002. *Entomopathogenic Nematology*. CABI Publishing, Wallingford.
- Georgis, R., Mullens, B.A., Meyer, J.A., 1987. Survival and movement of insect parasitic nematodes in poultry manure and their infectivity against *Musca domestica*. *J. Nematol.* 19, 292–295.
- Giraudoux, P., 2013. Pgrmss: Data Analysis in Ecology. R Package Version 1.5.8 <<http://CRAN.R-project.org/package=pgrmss>>.
- Givaudan, A., Lanois, A., 2000. *FlhDC*, the flagellar master operon of *Xenorhabdus nematophilus*: requirement for motility, lipolysis, extracellular hemolysis, and full virulence in insects. *J. Bacteriol.* 182, 107–115.
- Goodrich-Blair, H., Clarke, D.J., 2007. Mutualism and pathogenesis in *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: two roads to the same destination. *Mol. Microbiol.* 64, 260–268. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05671.x>.
- Han, R., Ehlers, R.-U., 2000. Pathogenicity, development, and reproduction of *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae* under axenic *in vivo* conditions. *J. Invertebr. Pathol.* 75, 55–58. <http://dx.doi.org/10.1006/jip.1999.4900>.
- Herbert, E.E., Goodrich-Blair, H., 2007. Friend and foe: the two faces of *Xenorhabdus nematophila*. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 634–646. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1706>.
- Hinchliffe, S.J., Hares, M.C., Dowling, A.J., French-Constant, R.H., 2010. Insecticidal Toxins from the *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* Bacteria. *Open Toxicol. J.* pp. 83 (special issue).
- Ji, D., Kim, Y., 2004. An entomopathogenic bacterium, *Xenorhabdus nematophila*, inhibits the expression of an antibacterial peptide, cecropin, of the beet

- armyworm, *Spodoptera exigua*. J. Insect Physiol. 50, 489–496. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2004.03.005>.
- Kaya, H.K., Gaugler, R., 1993. Entomopathogenic nematodes. Annu. Rev. Entomol. 38, 181–206. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.en.38.010193.001145>.
- Lanois, A., Jubelin, G., Givaudan, A., 2008. Fliz, a flagellar regulator, is at the crossroads between motility, haemolysin expression and virulence in the insect pathogenic bacterium *Xenorhabdus*. Mol. Microbiol. 68, 516–533. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06168.x>.
- Lee, M.-M., Stock, S.P., 2010a. A multigene approach for assessing evolutionary relationships of *Xenorhabdus* spp. (gamma-Proteobacteria), the bacterial symbionts of entomopathogenic *Steinernema* nematodes. J. Invertebr. Pathol. 104, 67–74. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2010.01.005>.
- Lee, M.-M., Stock, S.P., 2010b. A multilocus approach to assessing co-evolutionary relationships between *Steinernema* spp. (Nematoda: Steinernematidae) and their bacterial symbionts *Xenorhabdus* spp. (gamma-Proteobacteria: Enterobacteriaceae). Syst. Parasitol. 77, 1–12. <http://dx.doi.org/10.1007/s11230-010-9256-9>.
- Lemaitre, B., Hoffmann, J., 2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*. Annu. Rev. Immunol. 25, 697–743. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141615>.
- Lemaitre, B., Reichhart, J.-M., Hoffmann, J.A., 1997. *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94, 14614–14619.
- Morton, A., Del Pino, F.G., 2008. Effectiveness of different species of entomopathogenic nematodes for biocontrol of the Mediterranean flatheaded rootborer, *Capnodis tenebrionis* (Linné) (Coleoptera: Buprestidae) in potted peach tree. J. Invertebr. Pathol. 97, 128–133. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2007.09.003>.
- Mráček, Z., Sturhan, D., Reid, A., 2003. *Steinernema weiseri* n. sp. (Rhabditida, Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Europe. Syst. Parasitol. 56, 37–47. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1025531302519>.
- Nguyen, K.B., Půža, V., Mráček, Z., 2008. *Steinernema cholashanense* n. sp. (Rhabditida, Steinernematidae) a new species of entomopathogenic nematode from the province of Sichuan, Chola Shan Mountains, China. J. Invertebr. Pathol. 97, 251–264. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2007.06.006>.
- Nielsen-LeRoux, C., Gaudriault, S., Ramarao, N., Lereclus, D., Givaudan, A., 2012. How the insect pathogen bacteria *Bacillus thuringiensis* and *Xenorhabdus/Photorhabdus* occupy their hosts. Curr. Opin. Microbiol. 15, 220–231. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2012.04.006>.
- Ogier, J.-C., Pagès, S., Bisch, G., Chiapello, H., Médigue, C., Rouy, Z., Teyssier, C., Vincent, S., Tailliez, P., Givaudan, A., Gaudriault, S., 2014. Attenuated virulence and genomic reductive evolution in the entomopathogenic bacterial symbiont species, *Xenorhabdus poinarii*. Genome Biol. Evol., doi:10.1093/gbe/evu119.
- Poinar, G.O., 1966. The presence of *Achromobacter nematophilus* in the infective stage of a *Neoaplectana* sp. (Steinernematidae: Nematoda). Nematologica 12, 105–108. <http://dx.doi.org/10.1163/187529266X00068>.
- Poinar Jr., G.O., 1990. Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. In: Gaugler, R., Kaya, H.K. (Eds.), Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 23–61.
- Poinar, G.O., Thomas, G.M., 1966. Significance of *Achromobacter nematophilus* Poinar and Thomas (Achromobacteraceae: Eubacteriales) in the development of the nematode, DD-136 (*Neoaplectana* sp., Steinernematidae). Parasitology 56, 385–390. <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182000070980>.
- Poitout, S., Buès, R., 1970. Elevage de plusieurs espèces de Lépidoptères (Noctuidae) sur milieu artificiel riche et sur milieu artificiel simplifié. Ann. Zool. Ecol. Anim., 79–91.
- Půža, V., Mráček, Z., 2009. Mixed infection of *Galleria mellonella* with two entomopathogenic nematode (Nematoda: Rhabditida) species: *Steinernema affine* benefits from the presence of *Steinernema kraussei*. J. Invertebr. Pathol. 102, 40–43. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.005>.
- R Core Team, 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria <<http://www.R-project.org/>>.
- Rosa, J.S., Cabral, C., Simões, N., 2002. Differences between the pathogenic processes induced by *Steinernema* and *Heterorhabditis* (Nemata: Rhabditida) in *Pseudaletia unipuncta* (Insecta: Lepidoptera). J. Invertebr. Pathol. 80, 46–54.
- San-Blas, E., Gowen, S.R., 2008. Facultative scavenging as a survival strategy of entomopathogenic nematodes. Int. J. Parasitol. 38, 85–91. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.06.003>.
- Sicard, M., Le Brun, N., Pages, S., Godelle, B., Boemare, N., Moulia, C., 2003. Effect of native *Xenorhabdus* on the fitness of their *Steinernema* hosts: contrasting types of interaction. Parasitol. Res. 91, 520–524. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-003-0998-z>.
- Sicard, M., Brugirard-Ricaud, K., Pagès, S., Lanois, A., Boemare, N.E., Brehélin, M., Givaudan, A., 2004. Stages of infection during the tripartite interaction between *Xenorhabdus nematophila*, its nematode vector, and insect hosts. Appl. Environ. Microbiol. 70, 6473–6480. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.70.11.6473-6480.2004>.
- Simões, N., Caldas, C., Rosa, J., Bonifassi, E., Laumond, C., 2000. Pathogenicity caused by high virulent and low virulent strains of *Steinernema carpocapsae* to *Galleria mellonella*. J. Invertebr. Pathol. 75, 47–54. <http://dx.doi.org/10.1006/jipa.1999.4899>.
- Song, C.J., Seo, S., Shrestha, S., Kim, Y., 2011. Bacterial metabolites of an entomopathogenic bacterium, *Xenorhabdus nematophila*, inhibit a catalytic activity of phenoloxidase of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. J. Microbiol. Biotechnol. 21, 317–322.
- Spiridonov, S., Krasomil-Osterfeld, K., Moens, M., 2004. *Steinernema jolietii* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from the American midwest. Russ. J. Nematol. 12, 85–95.
- Stock, S.P., Goodrich Blair, H., 2008. Entomopathogenic nematodes and their bacterial symbionts: the inside out of a mutualistic association. Symbiosis 46, 65–75.
- Sugar, D.R., Murfin, K.E., Chaston, J.M., Andersen, A.W., Richards, G.R., deLéon, L., Baum, J.A., Clinton, W.P., Forst, S., Goldman, B.S., Krasomil-Osterfeld, K.C., Slater, S., Stock, S.P., Goodrich-Blair, H., 2012. Phenotypic variation and host interactions of *Xenorhabdus bovienii* SS-2004, the entomopathogenic symbiont of *Steinernema jolietii* nematodes. Environ. Microbiol. 14, 924–939. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02663.x>.
- Sutcliffe, D.W., 1963. The chemical composition of haemolymph in insects and some other arthropods, in relation to their phylogeny. Comp. Biochem. Physiol. 9, 121–135. [http://dx.doi.org/10.1016/0010-406X\(63\)90016-1](http://dx.doi.org/10.1016/0010-406X(63)90016-1).
- Tailliez, P., Pagès, S., Ginibre, N., Boemare, N., 2006. New insight into diversity in the genus *Xenorhabdus*, including the description of ten novel species. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56, 2805–2818. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.64287-0>.
- Therneau, T.M., 2013. A Package for Survival Analysis in S. R package version 2.37-4 <<http://CRAN.R-project.org/package=survival>>.
- Therneau, T.M., Grambsch, P.M., 2000. Modeling Survival Data: Extending the Cox Model. Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg.
- Thomas, G.M., Poinar, G.O., 1979. *Xenorhabdus* gen. nov., a Genus of Entomopathogenic, Nematophilic Bacteria of the Family Enterobacteriaceae. Int. J. Syst. Bacteriol. 29, 352–360. <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-29-4-352>.
- Thurston, G.S., Yule, W.N., 1990. Control of larval northern corn rootworm (*Diabrotica barberi*) with two Steinernematid Nematode Species. J. Nematol. 22, 127–131.
- Vigneux, F., Zumbihl, R., Jubelin, G., Ribeiro, C., Poncet, J., Baghdiguian, S., Givaudan, A., Brehélin, M., 2007. The *xaxAB* genes encoding a new apoptotic toxin from the insect pathogen *Xenorhabdus nematophila* are present in plant and human pathogens. J. Biol. Chem. 282, 9571–9580. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M604301200>.
- Wang, Y., Campbell, J.F., Gaugler, R., 1995. Infection of entomopathogenic nematodes *Steinernema glaseri* and *Heterorhabditis bacteriophora* against *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) Larvae. J. Invertebr. Pathol. 66, 178–184. <http://dx.doi.org/10.1006/jipa.1995.1081>.

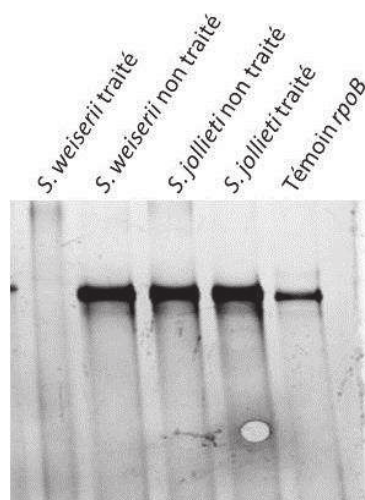


Figure 12. Recherche du symbionte *Xenorhabdus* chez les nématodes traités et non traités par les antibiotiques. Le gène *rpoB* a été recherché par PCR à dans les broyats d'IJ traités et non traités par les antibiotiques. Le témoin *rpoB* a été amplifié à partir d'ADN génomique purifié de *Xb* CS03.

III- Efficacité du parasitisme par les *Steinernema* aposymbiotiques

Nous avons montré que le couple némato-bactérien *S. weiseri-Xb* CS03 avait une virulence atténuée sur *S. littoralis* et *G. mellonella* par rapport aux autres couples *Steinernema-Xb*, et que la bactérie *Xb* CS03, prise individuellement, était non-virulente par injection directe. Nous nous sommes intéressés dans un second temps à la virulence du nématode *S. weiseri* (souche 583) seul, afin de déterminer le degré de complémentation entre les deux partenaires du couple.

A. Matériel et méthodes

1. Obtention des nématodes aposymbiotiques

Des IJ aposymbiotiques (exempts de leur *Xb* symbiotique) ont été créés pour les souches *S. weiseri* 583 et *S. jolietii* selon la méthode décrite par Martens et Goodrich-Blair (2005). En bref, des IJ de chacune des deux souches ont été incubés dans de l'hémolymphe de larves de *S. littoralis* (stade L6) filtrée (0,22 µm) additionnée de glutathion (Sigma) et de plusieurs antibiotiques (chloramphénicol 60 µg/mL, ampicilline 300 µg/mL, gentamicine 60 µg/mL, kanamycine 100 µg/mL, streptomycine 100 µg/mL, tétracycline 100 µg/mL, rifampicine 200 µg/mL, érythromycine 200 µg/mL, acide nalidixique 50 µg/mL ; Sigma). Les IJ ont été laissés en contact avec l'hémolymphe durant 16 à 20h, puis placés sur un milieu TSA-foie (Tryptycase Soja Agar, Sigma; foie de porc, 100g/L) contenu dans une boîte de Pétri de diamètre 3,5 mm. La boîte de Pétri contenant le milieu TSA-foie a ensuite été placée dans une boîte de diamètre supérieur (140 mm) contenant du liquide de Ringer (Merck), dans lequel les IJ pouvaient migrer. Les IJ potentiellement aposymbiotiques ont été récoltés à partir du liquide de Ringer au bout de 1 à 3 mois.

2. Vérification de l'absence de symbionte chez les *Steinernema* traités

L'absence du symbionte *X. bovienii* a été vérifiée dans les nématodes traités par les antibiotiques. Les *Steinernema* (~1000 IJ) traités et non traités ont tout d'abord subi un cycle de congélation-décongélation (-80°C, 30 min ; 100°C ; 20 min) puis ont été broyés dans un broyeur Potter-Elvehjem. L'ADN total a été extrait du broyat grâce au kit « Nucleo-Spin Tissue » (Macherey-Nagel) en suivant les instructions du fabricant. Le gène bactérien *rpoB* a ensuite été amplifié par deux PCR successives (PCR 1 : T_m=52°C, élongation : 1 min ; PCR 2 : T_m=60°C ; élongation : 30 sec), en utilisant des amorces universelles (PCR 1 : 5'-CGY TGC ATG TTB GMR CCC ATC A-3' et 5'-ATG CCD CAR GAY HTG ATC AAC GC-3' ; PCR 2 : 5'-CGC CCC CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCC CCG CCC CAA CAT CGG TCT GAT T-3' et 5'-CGT TGC ATG TTG GTA CCC AT-3'), puis les produits de PCR ont été séparés par DGGE (*denaturing gradient gel electrophoresis*) (100V, 100 mA, 50W).

3. Mesure de la virulence des nématodes aposymbiotiques

L'infestation de larves de *S. littoralis* par 100 nématodes ainsi que le suivi de la mortalité, du succès parasitaire et du succès reproducteur ont été réalisés comme décrit dans l'article 2. La mortalité et le

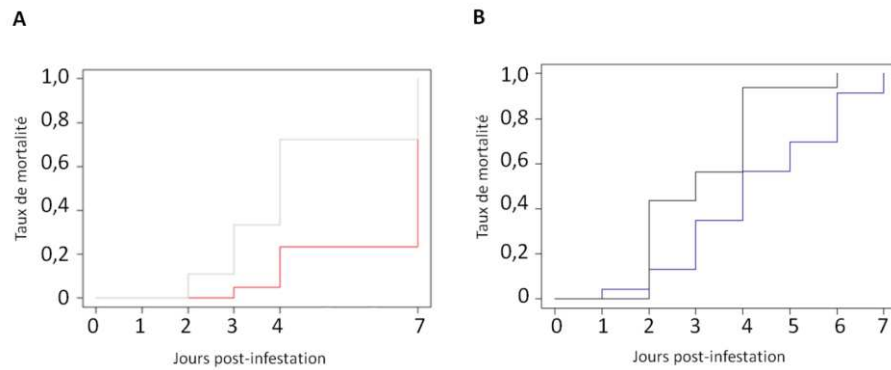


Figure 13. Taux de mortalité induit par les souches sauvages et aposymbiotiques de *S. weiseri* (A) et *S. jolietii* (B) chez *S. littoralis*. Les courbes représentent les résultats de deux expériences indépendantes (20-60 insectes). A- Mortalité induite par la souche sauvage (gris) et aposymbiotique (rouge) de *S. weiseri*. B- Mortalité induite par la souche sauvage (noir) et aposymbiotique (bleu) de *S. jolietii*.

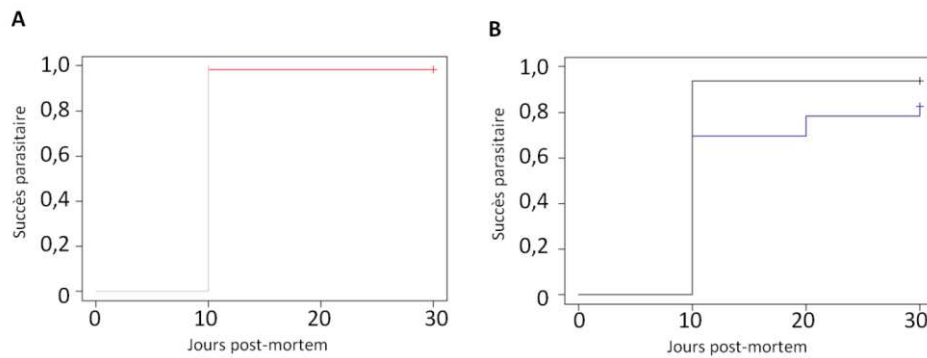


Figure 14. Succès parasitaire des souches sauvages et aposymbiotiques de *S. weiseri* (A) et *S. jolietii* (B) chez *S. littoralis*. Les courbes représentent les résultats de deux expériences indépendantes (20-60 insectes). A- Succès parasitaire de la souche sauvage (gris) et aposymbiotique (rouge) de *S. weiseri*. B- Succès parasitaire de la souche sauvage (noir) et aposymbiotique (bleu) de *S. jolietii*.

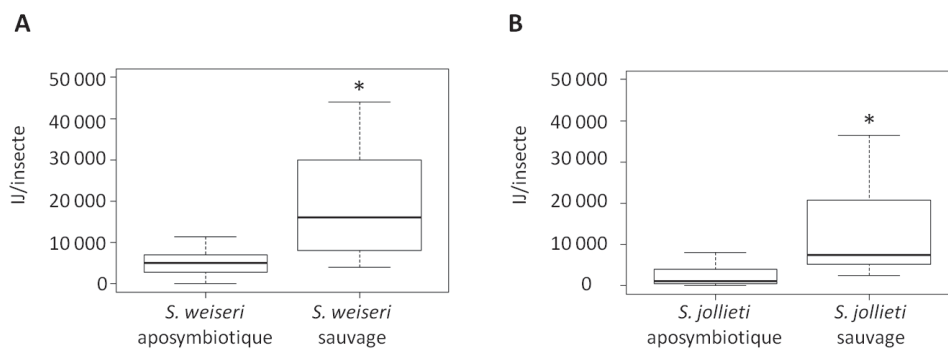


Figure 15. Succès reproducteur des souches sauvages et aposymbiotiques de *S. weiseri* (A) et *S. jolietii* (B) chez *S. littoralis*. Les graphes représentent les résultats de deux expériences indépendantes (20-60 insectes). Les résultats sont donnés sous forme de boîte à moustaches, où les barres horizontales indiquent la médiane, les boîtes les premiers et troisième quartiles et les « moustaches » la répartition des données. Les étoiles indiquent les différences statistiquement significatives (Test de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$).

succès parasitaire ont été analysés en utilisant des tests de Cox ; nous avons utilisé des tests de Kruskal-Wallis afin de comparer le succès reproducteur des nématodes sauvages et aposymbiotiques.

B. Résultats

1. Les nématodes *S. jolietii* restent contaminés par leur symbionte

Nous avons créé des nématodes aposymbiotiques (exempts de *Xenorhabdus* symbiotique) des espèces *S. weiseri* (souche 583) et *S. jolietii*, associées respectivement à *Xb* CS03 et *Xb* SS-2004. Après un traitement antibiotique pour éliminer le symbionte, nous n'avons pas pu amplifier le gène *rpoB* de *Xenorhabdus* à partir des nématodes *S. weiseri* 583, ce qui prouve qu'ils sont bien exempts de leur symbionte (Figure 12). Nous avons en revanche pu amplifier un gène correspondant au *rpoB* de *X. bovienii* chez les *S. jolietii* traités, qui contenaient donc toujours des symbiontes *Xb* SS-2004.

2. Virulence des *Steinernema* aposymbiotiques sur les larves de *S. littoralis*

Dans des conditions de bio-essais identiques, les nématodes aposymbiotiques de la souche *S. weiseri* 583 causent une mortalité retardée des larves de *S. littoralis* (4-7 jours post-infestation) par rapport aux nématodes contenant leur symbionte *Xb* CS03 (moins de 4 jours post-infestation, $\chi^2 > 3,481$, $df=1$, $p < 0,05$, Figure 13A). Les nématodes de l'espèce *S. jolietii* sont toujours contaminés par leur symbionte après le traitement aux antibiotiques, cependant les nématodes traités causent une mortalité légèrement retardée par rapport aux *S. jolietii* sauvages (100% de mortalité 7 jours post-infestation au lieu de 6 jours, $\chi^2 > 3,481$, $df=1$, $p < 0,05$, Figure 13B). Toutes les larves infestées étaient mortes 7 jours après leur infestation (Figure 13).

3. Reproduction du nématode

a. Succès parasitaire

Les nématodes *S. weiseri* 583 aposymbiotiques ont le même succès parasitaire ($\chi^2 < 3,481$, $df=1$, $p > 0,05$) que les nématodes sauvages : une nouvelle génération de nématodes émerge de 90 à 100% des insectes dès 10 jours après leur mort (Figure 14A). De la même façon, nous n'avons pas pu mettre en évidence de différence dans le succès parasitaire des *S. jolietii* sauvages et aposymbiotiques ($\chi^2 < 3,481$, $df=1$, $p > 0,05$, Figure 14B).

b. Succès reproducteur

Pour *S. weiseri* 583 comme pour *S. jolietii*, les souches aposymbiotiques voient leur succès reproducteur fortement diminué (Figure 15). Chez *S. weiseri* 583, on passe d'une émergence médiane de 16 000 IJ par insecte chez la souche sauvage à 5000 IJ par insecte chez la souche aposymbiotique ($\chi^2 > 3,481$, $df=1$, $p < 0,05$, Figure 15A). Chez *S. jolietii*, les nématodes se reproduisent difficilement, même en présence de la bactérie symbiotique. L'émergence médiane passe de 7500 à 1000 IJ par insecte après traitement ($\chi^2 > 3,481$, $df=1$, $p < 0,05$, Figure 15B).

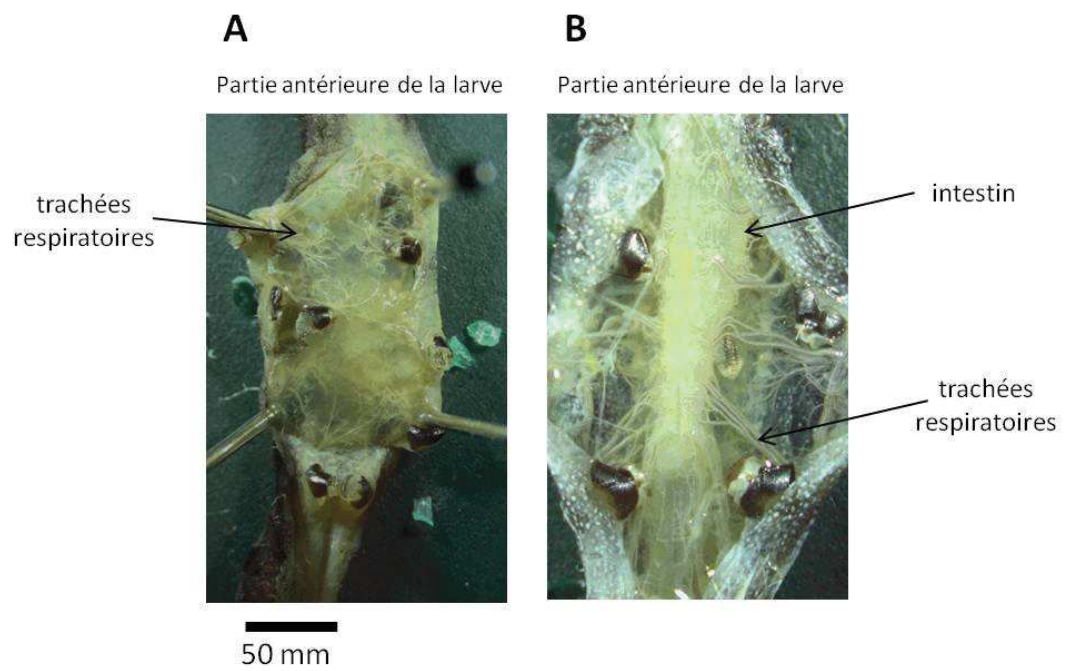


Figure 16. L'intestin de larves de *S. littoralis* infestées par les souches de *S. weiseri* sauvage (A) et aposymbiotique (B) 4 jours post-mortem.

c. Dégradation du cadavre des larves de *S. littoralis*

La dissection de larves d'insectes infestées par les souches sauvage et aposymbiotique de *S. weiseri* 583 4 jours après leur mort montre une forte différence dans la dégradation du cadavre (Figure 16). Dans le cas de l'infestation par une souche sauvage, l'intestin est complètement dégradé 4 jours après la mort de l'insecte (Figure 16A). En revanche, dans le cas de l'infestation par *S. weiseri* 583 aposymbiotique, l'intestin reste intact (Figure 16B). Il est donc très probable que le faible succès reproducteur de la souche aposymbiotique de *S. weiseri* 583 soit dû à l'absence de dégradation du cadavre par sa bactérie symbiotique.

4. Discussion et conclusion

Nous n'avons pas été en mesure de supprimer totalement la bactérie symbiotique *Xb* SS-2004 du nématode *S. jolietii*. Cependant, nous avons également pu mettre en évidence un retard de mortalité des insectes et un faible succès reproducteur dans le cas du nématode traité. Il est possible que dans le cas de *S. jolietii*, une population mixte ait émergé après le traitement antibiotique, certains nématodes contenant encore *Xb* SS-2004 et d'autres totalement aposymbiotiques. Néanmoins, le nombre total de bactéries contenu dans la population de nématodes ayant diminué, la virulence et la reproduction du nématode ont été amoindries. Il est également possible, au regard de la faible reproduction du nématode traité, que l'obtention d'une population totalement aposymbiotique de *S. jolietii* soit impossible, le nématode dépendant trop fortement de la bactérie.

Chez *S. weiseri* 583, la mortalité provoquée par le nématode aposymbiotique est plus lente que celle provoquée par le nématode sauvage, associé à *Xb* CS03. L'absence de la bactérie réduit également fortement la reproduction du nématode, probablement à cause d'un manque de nutriments dû à la non-dégradation du cadavre de l'insecte. Cependant, le nématode reste capable de tuer l'insecte et de s'y multiplier en l'absence de son symbionte. Une telle tendance a déjà été décrite chez *S. carpocapsae*, qui, en l'absence de son symbionte *X. nematophila*, est également capable de tuer et de se reproduire dans les insectes (Han & Ehlers, 2000; Simões *et al.*, 2000). Ceci peut être lié à deux phénomènes non-exclusifs :

- *Steinernema* peut lui-même sécréter des facteurs de virulence provoquant la mort de l'insecte. Ainsi, *S. carpocapsae* sécrète pendant l'infection de nombreuses protéases (Hao *et al.*, 2010) capables de dégrader les tissus de l'insecte (Jing *et al.*, 2010; Toubarro *et al.*, 2010) ou ciblant le système immunitaire de l'insecte (Balasubramanian *et al.*, 2010; Toubarro *et al.*, 2013).
- Lors de son entrée dans l'insecte, le nématode est accompagné de nombreuses bactéries venant de l'environnement, de sa cuticule ou de l'insecte lui-même (Lysenko & Weiser, 1974;

Gouge & Snyder, 2006; Razia *et al.*, 2011). Ces espèces différentes de *Xenorhabdus* peuvent jouer un rôle dans la mort de l'insecte. Ainsi, des bactéries de l'espèce *Enterobacter faecalis* peuvent passer de l'intestin à l'hémolymphe lors de l'infestation d'un insecte par *S. carpocapsae* ; ces bactéries sont capables de se multiplier dans l'hémolymphe en même temps que *Xenorhabdus* et pourraient jouer un rôle dans la mort de l'insecte (Singh *et al.*, 2014).

IV- Conclusion du chapitre II : des interactions *Steinernema-Xb* plus ou moins fortes

Dans ce chapitre, nous étudions les interactions entre différentes espèces de *Steinernema* et *X. bovienii*. Nous avons tout d'abord pu identifier un couple, *S. weiseri-Xb* CS03, qui cause une mortalité retardée et a un succès parasitaire et reproducteur moindre sur *S. littoralis*, par rapport aux autres couples *Steinernema-Xb*. Cette virulence atténuée pourrait être due à une spécialisation de l'association *S. weiseri-Xb* CS03 envers un insecte hôte. Les autres couples *Steinernema-Xb* que nous avons testés, plus généralistes, seraient alors plus virulents envers nos insectes modèles.

Lorsqu'on dissocie le nématode et son symbionte bactérien, le partenaire nématode de l'association *S. weiseri-Xb* CS03 voit sa virulence et son succès reproducteur fortement atténués lorsqu'il est privé de sa bactérie symbiotique. Le même résultat a été obtenu chez *S. jolietii*, qui a été partiellement privé de son symbionte *Xb* SS-2004. Dans les deux cas, le nématode est donc dépendant de sa bactérie symbiotique pour sa survie à long terme. Nous en effet avons pu constater que le nématode *S. weiseri* 583 aposymbiotique était incapable de dégrader le cadavre de l'insecte sans son symbionte. Le partenaire bactérien du couple *S. weiseri-Xb* CS03 est quant à lui non-virulent par injection dans nos insectes modèles, au contraire des autres souches de *Xb* que nous avons testées. *Xb* CS03 est en effet incapable de causer une septicémie après son injection dans l'hémolymphe de l'insecte, au contraire de la souche virulente *Xb* SS-2004. Nous avons pu montrer que *Xb* CS03 est sensible aux peptides antimicrobiens sécrétés par l'insecte, alors que *Xb* SS-2004 y résiste. Il semble donc que, dans le couple *S. weiseri-Xb* CS03, le nématode soit capable de protéger la bactérie de l'action de ces peptides antimicrobiens.

Ainsi, dans l'association *S. weiseri-Xb* CS03, l'interaction entre la bactérie et le nématode semble particulièrement forte, au contraire de ce qui se passe pour l'association *S. jolietii-Xb* SS-2004 où la bactérie cause une pathologie indépendamment du nématode. Au sein d'une même espèce de *Xenorhabdus*, on peut ainsi trouver des bactéries fortement dépendantes de leur nématode et d'autres virulentes indépendamment du nématode. L'étude des génomes de ces bactéries pourrait aider à comprendre de telles différences.

Chapitre 3 : Description génomique de la souche non-virulente *X. bovienii* CS03

Le chapitre qui suit s'appuie sur l'article 3 : Gaëlle Bisch, Jean-Claude Ogier, Claudine Médigue, Zoé Rouy, Stéphanie Vincent, Patrick Tailliez, Alain Givaudan and Sophie Gaudriault, «Comparative genomics within *Xenorhabdus bovienii* species highlights two evolutionary scenarios for the symbiotic association with entomopathogenic nematodes» (en préparation pour «MBio»).

Cet article décrit une comparaison génomique entre la souche non-virulente *Xb* CS03 et la souche virulente *Xb* SS-2004. Nous y proposons des scénarios évolutifs pouvant avoir mené à la non-virulence de la souche *Xb* CS03.

Comparative genomics within *Xenorhabdus bovienii* species highlights two evolutionary scenarios for the symbiotic association with entomopathogenic nematodes

Gaëlle Bisch^{1,2}, Jean-Claude Ogier^{1,2}, Claudine Médigue³, Zoé Rouy³, Stéphanie Vincent³, Patrick Tailliez^{1,2}, Alain Givaudan^{1,2} and Sophie Gaudriault^{1,2}

¹ Diversité, Génomique et Interactions Microorganismes-Insectes (DGIMI), Institut National de la Recherche Agronomique, 34095 Montpellier Cedex 05, France

² Diversité, Génomique et Interactions Microorganismes-Insectes (DGIMI), Université Montpellier 2, 34095 Montpellier Cedex 05, France

³ CEA, Genoscope & CNRS-UMR 8030, Laboratoire d'Analyse Bioinformatique en Génomique et Métabolisme, 91006 Evry Cedex, France

Abstract

Bacteria of the genus *Xenorhabdus* are symbionts of soil entomopathogenic nematodes of the genus *Steinernema*. This symbiotic association constitutes an insecticidal complex active against a wide range of insect pests. Within *Xenorhabdus bovienii* species, *X. bovienii* CS03 (*Xb* CS03) is non-virulent when injected in lepidopteran insects. The genome of *Xb* CS03 was sequenced and compared to the genome of a virulent strain, *X. bovienii* SS-2004 (*Xb* SS-2004). The *Xb* CS03 genome was characterized by a large size and an elevated number of pseudogenes. Those degraded genes included potential virulence factors (invasins, fimbriae, haemolysin). However, *Xb* CS03 was very rich in genes encoding NRPS/PKS (Non Ribosomal Peptide Synthetases/Polyketide Synthases), enzymes involved in the synthesis of secondary metabolites and especially antimicrobial compounds. Notably, *Xb* CS03 had a greater antimicrobial activity than *Xb* SS-2004. Those data suggest that *Xb* CS03 and *Xb* SS-

2004 followed divergent evolutionary strategies to cope with the cycle of the nematode-bacteria pair. *Xb* CS03 would be more efficient in the inhibition of bacterial competitors during the degradation of the insect cadaver whereas *Xb* SS-2004 would be more efficient in the virulence toward insect. This study represents a first step in the comprehension of the genomic diversity of the *Xenorhabdus* genus and will help understanding the host spectrum of the various species.

Key words

entomopathogenic bacteria, *Xenorhabdus bovienii*, comparative genomics, pseudogenes

Introduction

Soil entomopathogenic nematodes of the genus *Steinernema* depend on a mutualistic-symbiotic association with *Xenorhabdus* bacteria (Thomas & Poinar 1979) for their reproduction within insect larvae. When the nematodes penetrate into an insect hemocoel, they release *Xenorhabdus* bacteria, which multiply into the hemolymph and kill the insect by septicemia and toxemia (Boemare 2002). The bacteria then degrade the insect tissues, enabling nematode maturation and reproduction. After nutrient resources are depleted, the juvenile nematodes switch to the infective juvenile (IJ) stage, which reassociates with the bacteria, leaving the cadaver in search for a new host (Poinar 1990; Goodrich-Blair & Clarke 2007; Stock & Goodrich Blair 2008). *Steinernema* spp.-*Xenorhabdus* spp. pairs can be experimentally dissociated. In the *Steinernema carpocapsae*-*Xenorhabdus nematophila* pair, the *X. nematophila* bacteria alone are highly pathogenic when directly injected into the hemocoel of insect hosts (Poinar & Thomas 1966; Sicard et al. 2004). This property has made

50 *X. nematophila* the favorite model to study the bacterial symbiont role in the host-symbiont
51 interaction (Goodrich-Blair & Clarke 2007; Herbert & Goodrich-Blair 2007).

52 Among *Xenorhabdus* species, *Xenorhabdus bovienii* (*Xb*), associates with multiple
53 *Steinernema* found in different insect hosts in Europe, Asia and the Americas (Emelianoff et
54 al. 2008; Lee & Stock 2010a; Mráček et al. 2003; Nguyen et al. 2008; Spiridonov et al. 2004;
55 Tailliez et al. 2006). At present, *Xb* bacterial strains have been reported to be hosted by at
56 least nine *Steinernema* species from two phylogenetic sub-clades, the “*feltiae*” and the
57 “*affine*” clades (Lee & Stock 2010b). Following genomic and genetic studies, *Xb* SS-2004 has
58 become an alternative model to *X. nematophila* for studying interactions between
59 *Xenorhabdus* and its invertebrate hosts (Chaston et al. 2011; Sugar et al. 2012). We recently
60 described another strain, *Xb* CS03, which is impaired in its virulence towards lepidoptera.
61 Unlike *Xb* SS-2004, *Xb* CS03 is unable to cause septicemia and to kill the lepidopteran insect
62 models *Galleria mellonella* and *Spodoptera littoralis* when injected in the larvae hemocoel
63 (Bisch et al. 2014).

64 To date, the only other known examples of non-virulent *Xenorhabdus* strains are found in the
65 *X. poinarii* species. *X. poinarii* strains are non-virulent when injected into *S. littoralis* and *G.*
66 *mellonella* (Akhurst 1986; Ogier et al. 2014). Genomes of the *X. poinarii* strains are the
67 smallest described for the *Xenorhabdus* genus (3,4-3,7 Mb) (Ogier et al. 2014). The
68 sequenced genome of the *X. poinarii* G6 strain shows signs of reductive evolution, isolated
69 genes decay and excision of some genomic loci. Loss of some virulence factors could be
70 responsible for the attenuated virulence of the *X. poinarii* species during their injection (Ogier
71 et al. 2014). However, when *X. poinarii* is associated with its symbiotic nematode,
72 *Steinernema glaseri*, the pair is virulent towards several coleopteran insects (Wang et al.
73 1995, 199; Converse & Grewal 1998; Rosa et al. 2002; Fallon et al. 2006), indicating that the
74 nematode might complement the bacterial lost virulence functions. Indeed, genome reduction

in pathogenic and symbiotic bacteria is often linked to a greater reliance on the host (Moran et al. 2008; Ochman & Davalos 2006).

Contrarily to *X. poinarii*, where non-virulence is a feature shared by all strains, *Xb* CS03 is the first non-virulent strain described within the *Xb* species (Bisch et al. 2014). To understand how this non-virulent strain could emerge from a virulent species, we sequenced the genome of the *Xb* CS03 strain, and compared it to the genome of the virulent strain *Xb* SS-2004. Here we propose a first insight into the genomic diversity of the entomopathogenic *Xb* species.

Materials & Methods

Bacteria, nematodes and growth conditions

Xb CS03 (Tailliez et al. 2006) was isolated in Czech Republic (Europe) from the *Steinernema weiserii* 583 nematode (Mráček et al. 2003). The *Xb* SS-2004 (Chaston et al. 2011) used for the genome comparison was isolated in Missouri (Northern America) from the *Steinernema jolietii* nematode (Spiridonov et al. 2004). *Xb* strains were grown at 28°C. *Serratia marcescens*, *Corynebacterium xerosis*, *Bacillus megatherium*, *Enterobacter cloacae*, *Micrococcus luteus*, *Ochrobactrum intermedium*, *Proteus vulgaris* and *Pseudomonas putida* were grown at 37°C. All bacteria were routinely grown in Luria–Bertani (LB) broth or on nutrient agar (Difco). Kanamycin was added at 40 µg/mL when needed. Bacterial strains were stored at -80°C with 16% glycerol (v/v).

***Xenorhabdus* phenotype assays**

Antimicrobial activity of *Xb* CS03 and *Xb* SS-2004 against environmental bacterial strains and hemolytic activity were assessed as previously described in Boemare et al. (1997).

Sequencing and assembly of *Xb* CS03 genome

The complete genome of *Xb* CS03 was sequenced as previously described (Ogier et al. 2014) with 6531 Sanger reads, a 20-fold coverage of 454 GSflx reads, a 14-fold coverage of mate-paired 454 GSflx reads (library insert around 3 kbases) and a 110-fold coverage of Illumina reads (36 bp). For the finishing phases, primer walking of clones, PCRs and *in vitro* transposition technology was used generating 844, 286 and 3,028 additional reads.

Genomic analysis

Functional annotation of the *Xb* CS03 genome and analysis of the regions of genomic plasticity of *Xb* CS03 and *Xb* SS-2004 were carried out as previously described (Ogier et al. 2014). We used the SiLiX program (Miele et al. 2011) of the MicroScope platform to describe the pan-genome, core genome and flexible genomes inside the *Xenorhabdus* genus (homology constraints: 50% amino-acid identity and 80% alignment coverage) or inside the *Xb* species (homology constraints: 80% amino-acid identity and 80% alignment coverage). Strain-specific genes were manually classified according to their annotations.

Pseudogene detection

Pseudogenes were identified using the Gene Fission tool of the MicroScope platform. This tool provides a list of candidate genes potentially involved in a fission event (predicted pseudogenes). Fission events are computed from the synteny results obtained from the genomes available in the PkGDB database. Predicted pseudogenes were manually inspected to remove false positives on the basis of the gene size and identity compared to reference sequences. Pseudogenes were classified as specific (*i. e.* pseudogenized only in the reference genome) or non-specific (*i. e.* pseudogenized in both *Xb*). Functional categories were manually assigned to pseudogenes according their annotation.

Construction of recombinant *Xb* CS03

A *Xba*I-*Sal*I-fragment containing *xaxAB* was hydrolyzed from the pBB*xaxAB* build in a previous study (Vigneux et al. 2007). The *xaxAB* fragment was then ligated into the medium copy plasmid pBBR1-MCS2 (Kovach et al. 1995) hydrolyzed with *Sal*I and *Xba*I. The plasmid pBBMCS2-*xaxAB* was checked by sequencing (Millegen, Labège, France). In this construction the *xaxAB* locus is under the control of the P_{lac} promoter, whose transcriptional activity is constitutive in *Xenorhabdus*. Finally, pBBMCS2-*xaxAB* was introduced into *Xb* CS03 by mating as described in Givaudan & Lanois (2000).

Results

1. General genomic features of *Xb* CS03

Xb CS03 contains a 4,635,301 bp chromosome encoding 4757 coding sequences (Table 1). This is the largest chromosome described for a *Xenorhabdus* strain to date, the size of the other chromosomes ranging from 3,659,522 to 4,432,590 bp (Chaston et al. 2011; Ogier et al. 2014). *Xb* CS03 also contains a 177 kb megaplasmid (197 coding sequences) and a 8 kb plasmid (11 coding sequences) (Supplemental Table S1). In *Xb* CS03 plasmid, 73% of coding sequences are identical to coding sequences of the *X. doucetiae* plasmid (Ogier et al. 2014). *Xb* CS03 megaplasmid harbors 197 coding sequences, some of which encoding putative extracellular enzymes, putative antibiotic resistance cassettes, toxin-antitoxin systems and non-ribosomal peptide synthetase/polyketide synthases (NRPS/PKS). This content is largely different from the *X. nematophila* ATCC 19061 megaplasmid previously described (Chaston et al. 2011). By contrast, *Xb* CS03 megaplasmid shares 61, 57 and 44 orthologous coding sequences with the chromosome of *X. nematophila* ATCC19061, *Xb* SS-2004 and *Xb* CS03, respectively (best bi-directional hit, 35% amino-acid identity, 80% alignment coverage). This

suggests an elevated intragenomic flow between megaplasmid and chromosome, rather than an entire megaplasmid horizontal genetic transfer between *Xenorhabdus* strains. Four *Xenorhabdus* genomes, representative of four *Xenorhabdus* species, were previously compared. Pan and core genomes were composed of 7250 and 1904 gene families, respectively (Chaston et al. 2011; Ogier et al. 2014). The addition of the *Xb* CS03 genome in this analysis (homology constraints: 50% amino-acid identity and 80% alignment coverage) does not modify drastically the size of the *Xenorhabdus* core genome (1,873 gene families; Figure 1). However, the pan genome increased with the *Xb* CS03 genome (8454 gene families; Figure 1), which confirms the diversity of the flexible genome (pan genome minus core genome) of the *Xenorhabdus* genus (Ogier et al. 2010).

2. Genomic comparison inside the *Xb* species

2.1. General features

The availability of two *Xb* genomes (*Xb* CS03 and *Xb* SS-2004) allows for the first time comparative genomics inside a same *Xenorhabdus* species. Beside the size difference, comparison of general genomic features between *Xb* CS03 and *Xb* SS-2004 genomes highlights two main differences (Table 1). *Xb* SS-2004 genome is slightly richer (24%) in insertion sequences than *Xb* CS03 genome, and the number of pseudogenes in *Xb* CS03 genome is 52% higher than in *Xb* SS-2004 genome (Supplemental Table S2). Interestingly, among the 99 *Xb* CS03 pseudogenes, 40 matched with non-pseudogenized homologs in *Xb* SS-2004, whereas among the 65 *Xb* SS-2004 pseudogenes, only 17 matched with intact genes in *Xb* CS03. Hence, while the pseudogenes of *Xb* SS-2004 seem to belong to the *Xb* core-genome (*i.e.* degraded also in *Xb* CS03), 40% of *Xb* CS03 pseudogenes are strain-specific. Degraded genes targeted by the pseudogenization have been classified into nine functional categories (Cell division, DNA/RNA metabolism, Host/Environment interaction, Metabolism,

Phage/Recombination, Protein biosynthesis, Regulation, Transport and Unknown function) (Figure 2). *Xb* SS-2004 is particularly rich in pseudogenes from the “Phage/Recombination” category (32% of the pseudogenes). It has been proposed that pseudogenization in bacterial genomes could represent a mean of deleting genomic parasites, such as phages and transposases (Lawrence et al. 2001). This could account for this particularity of *Xb* SS-2004. However, the main difference is in the “Host and Environment Interaction” category, which represents 39% of the total pseudogenes content in *Xb* CS03 and only 26% of the *Xb* SS-2004 pseudogenes.

2.2. *Pan*, core and flexible genome

We compared the *Xb* CS03 and *Xb* SS-2204 genomic contents to bring out the *Xb* pan-genome, core-genome and *Xb* specific core-genome (without gene families present in *X. nematophila* ATCC19061, *X. doucetiae* FRM16 and *X. poinarii* G6), which were composed of 5762, 2673 and 1001 gene families respectively (Figure 3.A and Supplemental Table S3a and b). *Xb* CS03 and *Xb* SS-2004 flexible genomes contained 1,821 and 1,268 strain-specific gene families, respectively (Supplemental Tables 3c and 3d).

We examined the structure of *Xb* CS03 and *Xb* SS-2004 flexible genome by searching regions of genomic plasticity (Ogier et al. 2010). Among regions of genomic plasticity, some were genomic islands (GIs), prophage loci (P), regions of genomic plasticity with mobility features (M) or uncharacterized regions of genomic plasticity (RGP). We identified more regions of genomic plasticity in *Xb* CS03 flexible genome (69 chromosomal regions of genomic plasticity encompassing 14 GI, 10 P, 3M and 42 RGP; 25 % of the genome) than in *Xb* SS-2004 flexible genome (55 chromosomal regions of genomic plasticity encompassing 11 GI, 8P, 2 M and 34 RGP; 20% of the genome) (Supplemental Table S4). Among the *Xb* CS03 prophages, one additional prophage was located on the megaplasmid and another

(XBW1_1585-1616), similar to the xenorhabdicolin-encoding phage *xbpI* of *Xb* SS-2004 (Morales-Soto et al. 2012) has been named *xbwpI* (Supplemental Tables S4 and S5). Furthermore, one or several of these regions of genomic plasticity may be embedded in an integrative conjugative element (ICE; [Guglielmini et al. 2011; Ogier et al. 2014]). Four ICEs were identified in *Xb* CS03, among which only the ICE1 is entire (Supplemental Table S6) whereas two ICEs were previously described in *Xb* SS-2004 (Chaston et al. 2011; Ogier et al. 2014). Altogether, these data indicate a slightly larger flexible genome for *Xb* CS03, which is likely the consequence of the larger genome size.

We also examined the content of the flexible genomes of *Xb* SS-2004 and *Xb* CS03 and classified the genes according their function. The repartition of the strain-specific genes into the functional categories defined above was similar between *Xb* CS03 and *Xb* SS-2004, except a slight difference between the “Host/Environment interaction” and “Unknown function” classes (Figure 3.B).

3. Differences in “Host and environment interaction” functional category of the *Xb* CS03 and *Xb* SS-2004 flexible genomes

By comparison with *Xb* SS-2004, *Xb* CS03 genome displayed two remarkable features: a large flexible genome and an important content of pseudogenes specific to *Xb*CS03 and belonging therefore to the flexible genome. Furthermore, the coding sequences targeted by pseudogenization in the *Xb* CS03 genome are frequently annotated as potentially involved in the host and environment interactions. This set of data led us to focus on the “Host and Environment Interactions” functional class inside the flexible genome.

3. 1. Flexible genome of *Xb* CS03 is rich in coding sequence likely involved in the elimination of competitors

224 Upon further examination, the nature of the coding sequences from flexible genome classified
225 in the “Host and environment interaction” category is largely different between *Xb* CS03 and
226 *Xb* SS-2004 (Figure 3.C). First, the flexible genome of *Xb* CS03 is particularly rich in loci
227 encoding non-ribosomal peptide synthetases and polyketide synthases (NRPS/PKS), which
228 catalyze the synthesis of antimicrobial/immuno-modulative secondary metabolites or
229 siderophores (30% of the “Host and environment interaction” genes contained in the flexible
230 genome of *Xb* CS03, versus 10% in *Xb* SS-2004). Eight NRPS/PKS loci were absent from *Xb*
231 SS-2004 (Supplemental Table S7). Three of those specific *Xb* CS03 loci exhibit a conserved
232 genomic context between *Xb* CS03 and *Xb* SS-2004 (Figure 4A). Those loci are also absent
233 from *X. nematophila* ATCC19061, *X. doucetiae* FRM16 and *X. poinarii* G6, and hence may
234 have been acquired only by *Xb* CS03 during horizontal gene transfer events. The locus
235 responsible for the biosynthesis of the xenocoumacin, the main antimicrobial molecule
236 produced by *X. nematophila* (Park et al. 2009; McInerney et al. 1991), was absent from *Xb*
237 SS-2004 and *X. poinarii* G6, but was present in the other strains. Hence, it may have been
238 excised from *Xb* SS-2004 and *X. poinarii* G6. Several NRPS/PKS coding sequences of the *Xb*
239 SS-2004 flexible genome were degraded (26% of the “Host and Environment Interactions”
240 category). For example, an indigoidin/blue pigment NRPS-PKS gene (XBJ1_3767-3768) was
241 pseudogenized in *Xb* SS-2004. Indigoidin has a role in the pathogenicity of *Dickeya dadantii*
242 (Reverchon et al. 2002) and inhibits the competitors of the marine bacterium *Phaeobacter* sp.
243 (Cude et al. 2012). *Xb* CS03 also contained more coding sequence potentially involved in
244 bacteriophage resistance (RM systems), in persistence against antimicrobial metabolites
245 (toxin-antitoxin systems, [Wang & Wood 2011]) and NRPS-PKS-independent synthesis of
246 antimicrobial metabolites (competitor inhibition). For example, a putative nikkomycin
247 synthesis locus (XBW1v5_3291-XBWv5_3307) was only present in *Xb* CS03 (Figure 4B).
248 Nikkomycin is produced by *Streptomyces tendae* and has been shown to have an antifungal

activity against *S. cerevisiae* and the pathogenic fungi *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* (Hector 1993; Cabib 1991). In *Xb* CS03, the nikkomycin locus did not display features of typical GI, but was located in an RGP (RGP56), and its genomic context is conserved between *Xb* CS03 and *Xb* SS-2004. It is also absent from *X. nematophila* ATCC19061, *X. doucetiae* FRM16 and *X. poinarii* G6, which suggests that it has been horizontally transferred into the *Xb* CS03 genome. Altogether, 42% of the coding sequences in the “Host and environment interaction” category of the *Xb* CS03 flexible genome are potentially involved in the elimination of microbial competitors.

3. 2. Weak content and pseudogenization of the *Xb* CS03 flexible genome likely encoding virulence factors

At a first glance, *Xb* CS03 flexible genome displayed less coding sequences involved in bacterial invasion. Additionally, one could note an important pseudogenization of *Xb* CS03 coding sequences encoding regulators but also extracellular enzymes, invasins and toxins (Figure 3C).

As a first example, we noticed that in *Xb* CS03 *tc* loci were highly shuffled whereas there were at least one whole *tc* locus (A,B and C component) in *X. nematophila* ATCC19061 and *Xb* SS-2004 (Figure 5A). Particularly, no coding sequence encoding the C component was complete in the *Xb* CS03 genome. The *tc* loci of *Xenorhabdus* encode families of insecticidal toxins conserved in several other entomopathogenic bacteria and bacteria associated with insects (Hinchliffe et al. 2010). The Tc complex toxin is active by ingestion on insect gut epithelium (Bowen et al. 1998; Sheets et al. 2011) and inhibit phagocytosis by injection of the C component, a ADP-ribosyl transferase, inside the insect hemocytes (Lang et al. 2010).

In *Xb* CS03, we also identified pseudogenes corresponding to putative virulence factors in *Xb* SS-2004. The gene XBJ1_2377, which encodes a conserved hypothetical protein with a

putative adhesin domain, is interrupted in *Xb* CS03 by the insertion of a transposase gene (Figure 5B). The genomic locus *xaxAB* (XBJ1_1710-1711 in *Xb* SS-2004) encodes the hemolysin XaxAB, a binary pore-forming toxin with apoptotic and necrotic activity towards insect cells and probably required during the degradation of the insect cadaver in *X. nematophila* (Jubelin et al. 2011). In *Xb* CS03, both genes were pseudogenized: *xaxA* (XBWv5_1010-1032) was interrupted by a prophage insertion and *xaxB* (XBW1v5_1009-1010) was split in two fragments (Figure 5C).

4. Comparative antimicrobial activity of *Xb* CS03 and SS-2004

Since the flexible genome of *Xb* CS03 is richer than the flexible genome of *Xb* SS-2004 in coding sequences likely involved in the elimination of competitors, we compared the antimicrobial activity of *Xb* CS03 and *Xb* SS-2004 against *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens*, *Corynebacterium xerosis*, *Bacillus megatherium*, *Enterobacter cloacae*, *Ochrobactrum intermedium* and *Pseudomonas putida*, bacterial species that have been found in association either with the soil, with the insect *G. mellonella* or with entomopathogenic nematodes *Steinernema* (Boemare et al. 1983; Aguilera & Smart Jr. 1993; Lysenko & Weiser 1974; Gouge & Snyder 2006). *Micrococcus luteus* was used as reference strain to assess antimicrobial activities (Boemare et al. 1997). Interestingly, we found a strong antimicrobial activity of *Xb* CS03 against all the tested bacterial species, whereas *Xb* SS-2004 was only active against *M. luteus*, which is a rather sensitive strain (Table 2).

5. Complementation of the hemolytic activity of *Xb* CS03 by a functional *xaxAB* locus.

The flexible genome of *Xb* CS03 is poorer than the flexible genome of *Xb* SS-2004 in genes likely encoding virulence factors, either because the genes are absent or degraded. We focused on the *xaxAB* locus. *In vitro*, XaxAB displays an hemolytic activity against sheep

erythrocytes (Brillard et al. 2001). We tested the hemolytic activity of *Xb* CS03 and *Xb* SS-2004 on sheep red blood agar plates (Figure 6.A). *Xb* CS03, contrarily to *Xb* SS-2004, did not display a hemolysis halo around the bacteria. However, the *xaxA* and *xaxB* gene fragments are still transcribed in *Xb* CS03 during stationary phase (data not shown). The introduction into *Xb* CS03 of the pBBR1-*xaxAB* plasmid, which constitutively expresses the *xaxAB* locus from *X. nematophila*, complemented the hemolytic activity on this strain (Figure 6. B).

Discussion

The genomes of pathogenic and symbiotic bacteria undergo certain changes due to the close interaction with a host. In this respect, *Xenorhabdus* bacteria are great models to study those changes, because of their particular lifestyle which mixes virulence towards insect larvae and symbiosis with a nematode. Usually, in host-adapted symbionts, the small bacterial population size and the isolation of the symbionts limits the opportunities for horizontal gene transfer and recombination, leading to the decrease of the genome size, since the loss of genes due to the inherent deletional bias in bacterial genomes is not counterbalanced anymore (Mira et al. 2010). At the same time, some of the bacterial functions may be transferred to the host, which leads to the loss of the corresponding genes in the bacteria (McCutcheon & Moran 2012; Moran et al. 2008). The *X. poinarii* G6 reduced genome seems to be a good illustration of this process. Indeed, the *X. poinarii* G6 bacteria are non-virulent when injected into insect larvae (Akhurst 1986; Ogier et al. 2014), but the *S. glaseri*-*X. poinarii* association is virulent (Akhurst 1986; Converse & Grewal 1998; Rosa et al. 2002; Ansari et al. 2003). This indicates a complementation of the bacterial virulence functions by the nematode and explains the non-virulence of the *X. poinarii* bacteria when took individually.

Although the *Xb* CS03 strain is non-virulent when injected alone in the hemocoel of insect larvae, like *X. poinarii* G6, its genome is radically different. *X. poinarii* G6 had the smallest

genome described among the *Xenorhabdus* genus, but *Xb* CS03 has the largest one. Furthermore, the *Xb* CS03 genome is characterized by (i) important flexible genome, (ii) wealth of genes involved in eliminating microbial competitors, (iii) numerous pseudogenes.

Compared to *Xb* SS-2004, *Xb* CS03 displays a strong antimicrobial activity against several soil and insect-associated bacterial species. *Xb* CS03 harbors eight NRPS/PKS loci and a nikkomycin locus that probably have been acquired during horizontal gene transfer events. It is possible that the acquisition of genomic loci allowing the strong inhibition of competitors into the insect cadaver has led *Xb* CS03 to evolve differently from *Xb* SS-2004. Indeed, when parasites face a highly-competitive niche, a trade-off sets up between the virulence and competitor inhibition functions, leading the parasites to follow one of two alternative evolutionary pathways: (i) increasing their virulence and the rate of niche exploitation or (ii) inhibiting their competitors (Alizon & Lion 2011; Choisy & de Roode 2010). Both strategies are employed by different *Xenorhabdus* strains in the insect cadavers (Bashey et al. 2012, 2013; Massey et al. 2004). In the case of *Xb* CS03, maintaining an important flexible genome and synthesizing numerous antimicrobial compounds might be very demanding in terms of metabolism. As a result of the trade-off between virulence and antimicrobial activity, the selective purifying pressure on the toxin synthesis genes would increase, leading to their inactivation and the arrest of their expression.

In the *S. weiserii* 583-*Xb* CS03 pair, some of the virulence functions could also be assumed by the nematode. For example, we described the sensitivity of *Xb* CS03 to several antimicrobial peptides (Bisch et al. 2014). It has been demonstrated that *Steinernema feltiae*, which also associates with a *Xb* strain, is able to counteract the action of the antimicrobial peptides (Brivio et al. 2006). Hence, *S. weiseri* could protect the bacteria from the insect immune system, leading to as successful infestation. The complementation between the nematode and the bacterial functions could lead to the release of the selective pressure on the bacterial genes

assuming functions that are redundant with the nematode. The release of selection pressure acting on a gene leads to its inactivation by mutation, degradation or IS insertion (Mira et al. 2001; Ochman & Davalos 2006). Notably, in *Xb* CS03, some toxin loci are interrupted by the insertion of transposons or prophages, like the Tc toxin complex genes or the *xaxAB* locus. However, the fragments of *xaxAB* are still translated in *Xb* CS03, which suggests that there is no metabolic pressure to stop the expression of this locus.

Hence, the non-virulence of *Xb* CS03 when injected into the hemolymph of *S. littoralis* and *G. mellonella* could be linked to its closer interaction with *S. weiseri*, releasing the selective pressure on several host interaction genes, followed by their pseudogenization. This suggests that, within the *Xb* species, some strains have had very different evolutionary histories in function of the genes they acquired. This is underlined by the size of *Xb* CS03 and *Xb* SS-2004 flexible genomes, which represent more than a third of their gene content. *Xb* strains hence represent a great model to study the diversity of the *Xenorhabdus* genus. They use different ways to kill the insect larvae and may have different insect host spectrums. Because they associate to variable *Steinernema* species, they could use different mechanisms to establish the symbiosis. Each *Xb* strain also represents a potential source for new virulence genes and antimicrobial compounds.

374 **References**

- 375 Aguilera MM, Smart Jr. GC. 1993. Development, Reproduction, and Pathogenicity of
376 *Steinernema scapterisci* in Monoxenic Culture with Different Species of Bacteria. J.
377 Invertebr. Pathol. 62:289–294. doi: 10.1006/jipa.1993.1115.
- 378 Akhurst RJ. 1986. *Xenorhabdus nematophilus* subsp. *poinarii* - Its Interaction with Insect
379 Pathogenic Nematodes. Syst. Appl. Microbiol. 8:142–147.
- 380 Alizon S, Lion S. 2011. Within-host parasite cooperation and the evolution of virulence. Proc.
381 R. Soc. B-Biol. Sci. 278:3738–3747. doi: 10.1098/rspb.2011.0471.
- 382 Ansari M., Tirry L, Moens M. 2003. Entomopathogenic nematodes and their symbiotic
383 bacteria for the biological control of *Hoplia philanthus* (Coleoptera: Scarabaeidae). Biol.
384 Control. 28:111–117. doi: 10.1016/S1049-9644(03)00032-X.
- 385 Bashey F, Hawlena H, Lively CM. 2013. Alternative paths to success in a parasite
386 community: within-host competition can favor higher virulence or direct interference. Evol.
387 Int. J. Org. Evol. 67:900–907. doi: 10.1111/j.1558-5646.2012.01825.x.
- 388 Bashey F, Young SK, Hawlena H, Lively CM. 2012. Spiteful interactions between sympatric
389 natural isolates of *Xenorhabdus bovienii* benefit kin and reduce virulence. J. Evol. Biol.
390 25:431–437. doi: 10.1111/j.1420-9101.2011.02441.x.
- 391 Bisch G et al. 2014. *Xenorhabdus bovienii* CS03, the bacterial symbiont of the
392 entomopathogenic nematode *Steinernema weiseri*, is a non-virulent strain against lepidopteran
393 insects. J. Invertebr. Pathol. doi: 10.1016/j.jip.2014.10.002.
- 394 Boemare N. 2002. Biology, Taxonomy, and Systematics of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*.
395 In: Entomopathogenic Nematology. Gaugler, R, editor. CABI Publishing: Wallingford.
- 396 Boemare N, Bonifassi E, Laumond C, Luciani J. 1983. Etude expérimentale de l'action
397 pathogène du nématode *Neoaplectana carpocapsae* Weiser ; recherches gnotobiologiques
398 chez l'insecte *Galleria mellonella* L. ⁽¹⁾. Agronomie. 3:407–415. doi: 10.1051/agro:19830502.
- 399 Boemare N, Thaler JO, Lanois A. 1997. Simple bacteriological tests for phenotypic
400 characterization of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* phase variants. Symbiosis. 22:167–175.
- 401 Bowen D et al. 1998. Insecticidal Toxins from the Bacterium *Photorhabdus luminescens*.
402 Science. 280:2129–2132. doi: 10.1126/science.280.5372.2129.
- 403 Brillard J, Ribeiro C, Boemare N, Brehélin M, Givaudan A. 2001. Two distinct hemolytic
404 activities in *Xenorhabdus nematophila* are active against immunocompetent insect cells.
405 Appl. Environ. Microbiol. 67:2515–2525. doi: 10.1128/AEM.67.6.2515-2525.2001.
- 406 Brivio MF, Moro M, Mastore M. 2006. Down-regulation of antibacterial peptide synthesis in
407 an insect model induced by the body-surface of an entomoparasite (*Steinernema feltiae*). Dev.
408 Comp. Immunol. 30:627–638. doi: 10.1016/j.dci.2005.09.008.
- 409 Cabib E. 1991. Differential inhibition of chitin synthetases 1 and 2 from *Saccharomyces*
410 *cerevisiae* by polyoxin D and nikkomycins. Antimicrob. Agents Chemother. 35:170–173. doi:
411 10.1128/AAC.35.1.170.

412 Chaston JM et al. 2011. The Entomopathogenic Bacterial Endosymbionts *Xenorhabdus* and
413 *Photorhabdus*: Convergent Lifestyles from Divergent Genomes. PLoS ONE. 6:e27909. doi:
414 10.1371/journal.pone.0027909.

415 Choisy M, de Roode JC. 2010. Mixed Infections and the Evolution of Virulence: Effects of
416 Resource Competition, Parasite Plasticity, and Impaired Host Immunity. Am. Nat. 175:E105–
417 E118. doi: 10.1086/651587.

418 Converse V, Grewal PS. 1998. Virulence of entomopathogenic nematodes to the western
419 masked chafer *Cyclocephala hirta* (Coleoptera: Scarabaeidae). J. Econ. Entomol. 91:428–432.

420 Cude WN et al. 2012. Production of the Antimicrobial Secondary Metabolite Indigoidine
421 Contributes to Competitive Surface Colonization by the Marine Roseobacter *Phaeobacter* sp.
422 Strain Y4I. Appl. Environ. Microbiol. 78:4771–4780. doi: 10.1128/AEM.00297-12.

423 Emelianoff V et al. 2008. Isolation and identification of entomopathogenic nematodes and
424 their symbiotic bacteria from Hérault and Gard (Southern France). J. Invertebr. Pathol.
425 98:211–217. doi: 10.1016/j.jip.2008.01.006.

426 Fallon DJ et al. 2006. Effect of entomopathogenic nematodes on *Plectrodera scalator*
427 (Fabricius) (Coleoptera: Cerambycidae). J. Invertebr. Pathol. 92:55–57. doi:
428 10.1016/j.jip.2006.01.006.

429 Givaudan A, Lanois A. 2000. *flhDC*, the Flagellar Master Operon of *Xenorhabdus*
430 *nematophilus*: Requirement for Motility, Lipolysis, Extracellular Hemolysis, and Full
431 Virulence in Insects. J. Bacteriol. 182:107–115.

432 Goodrich-Blair H, Clarke DJ. 2007. Mutualism and pathogenesis in *Xenorhabdus* and
433 *Photorhabdus*: two roads to the same destination. Mol. Microbiol. 64:260–268. doi:
434 10.1111/j.1365-2958.2007.05671.x.

435 Gouge DH, Snyder JL. 2006. Temporal association of entomopathogenic nematodes
436 (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) and bacteria. J. Invertebr. Pathol.
437 91:147–157. doi: 10.1016/j.jip.2005.12.003.

438 Guglielmini J, Quintais L, Garcillán-Barcia MP, de la Cruz F, Rocha EPC. 2011. The
439 Repertoire of ICE in Prokaryotes Underscores the Unity, Diversity, and Ubiquity of
440 Conjugation. PLoS Genet. 7:e1002222. doi: 10.1371/journal.pgen.1002222.

441 Hector RF. 1993. Compounds active against cell walls of medically important fungi. Clin.
442 Microbiol. Rev. 6:1–21.

443 Herbert EE, Goodrich-Blair H. 2007. Friend and foe: the two faces of *Xenorhabdus*
444 *nematophila*. Nat. Rev. Microbiol. 5:634–646. doi: 10.1038/nrmicro1706.

445 Hinchliffe SJ, Hares MC, Dowling AJ, Ffrench-Constant RH. 2010. Insecticidal Toxins from
446 the *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* Bacteria. Open Toxicol. J. Special Issue:83.

447 Hood RD et al. 2010. A Type VI Secretion System of *Pseudomonas aeruginosa* Targets a
448 Toxin to Bacteria. Cell Host Microbe. 7:25–37. doi: 10.1016/j.chom.2009.12.007.

449 Jubelin G et al. 2011. Studies of the dynamic expression of the *Xenorhabdus* FliAZ regulon
 450 reveal atypical iron-dependent regulation of the flagellin and haemolysin genes during insect
 451 infection. *Environ. Microbiol.* 13:1271–1284. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02427.x.

452 Koskiniemi S et al. 2013. Rhs proteins from diverse bacteria mediate intercellular
 453 competition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110:7032–7037. doi: 10.1073/pnas.1300627110.

454 Kovach ME et al. 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector
 455 pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene.* 166:175–176. doi:
 456 10.1016/0378-1119(95)00584-1.

457 Lang AE et al. 2010. *Photorhabdus luminescens* Toxins ADP-Ribosylate Actin and RhoA to
 458 Force Actin Clustering. *Science.* 327:1139–1142. doi: 10.1126/science.1184557.

459 Lawrence JG, Hendrix RW, Casjens S. 2001. Where are the pseudogenes in bacterial
 460 genomes? *Trends Microbiol.* 9:535–540.

461 Lee M-M, Stock SP. 2010a. A multigene approach for assessing evolutionary relationships of
 462 *Xenorhabdus* spp. (gamma-Proteobacteria), the bacterial symbionts of entomopathogenic
 463 *Steinernema* nematodes. *J. Invertebr. Pathol.* 104:67–74. doi: 10.1016/j.jip.2010.01.005.

464 Lee M-M, Stock SP. 2010b. A multilocus approach to assessing co-evolutionary relationships
 465 between *Steinernema* spp. (Nematoda: Steinernematidae) and their bacterial symbionts
 466 *Xenorhabdus* spp. (gamma-Proteobacteria: Enterobacteriaceae). *Syst. Parasitol.* 77:1–12. doi:
 467 10.1007/s11230-010-9256-9.

468 Lima-Mendez G, Van Helden J, Toussaint A, Leplae R. 2008. Prophinder: a computational
 469 tool for prophage prediction in prokaryotic genomes. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 24:863–865.
 470 doi: 10.1093/bioinformatics/btn043.

471 Lysenko O, Weiser J. 1974. Bacteria associated with the nematode *Neoaeplectana*
 472 *carpocapsae* and the pathogenicity of this complex for *Galleria mellonella* larvae. *J.*
 473 *Invertebr. Pathol.* 24:332–336. doi: 10.1016/0022-2011(74)90140-2.

474 Massey RC, Buckling A, ffrench-Constant R. 2004. Interference competition and parasite
 475 virulence. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 271:785–788.

476 McCutcheon JP, Moran NA. 2012. Extreme genome reduction in symbiotic bacteria. *Nat.*
 477 *Rev. Microbiol.* 10:13–26. doi: 10.1038/nrmicro2670.

478 McInerney BV, Taylor WC, Lacey MJ, Akhurst RJ, Gregson RP. 1991. Biologically active
 479 metabolites from *Xenorhabdus* spp., Part 2. Benzopyran-1-one derivatives with
 480 gastroprotective activity. *J. Nat. Prod.* 54:785–795.

481 Miele V, Penel S, Duret L. 2011. Ultra-fast sequence clustering from similarity networks with
 482 SiLiX. *BMC Bioinformatics.* 12:116. doi: 10.1186/1471-2105-12-116.

483 Mira A, Martín-Cuadrado AB, D’Auria G, Rodríguez-Valera F. 2010. The bacterial pan-
 484 genome: a new paradigm in microbiology. *Int. Microbiol. Off. J. Span. Soc. Microbiol.*
 485 13:45–57.

486 Mira A, Ochman H, Moran NA. 2001. Deletional bias and the evolution of bacterial genomes.
487 Trends Genet. TIG. 17:589–596.

488 Morales-Soto N, Gaudriault S, Ogier J-C, Thappeta KRV, Forst S. 2012. Comparative
489 analysis of P2-type remnant prophage loci in *Xenorhabdus bovienii* and *Xenorhabdus*
490 *nematophila* required for xenorhabdicolin production. FEMS Microbiol. Lett. 333:69–76. doi:
491 10.1111/j.1574-6968.2012.02600.x.

492 Moran NA, McCutcheon JP, Nakabachi A. 2008. Genomics and evolution of heritable
493 bacterial symbionts. Annu. Rev. Genet. 42:165–190. doi:
494 10.1146/annurev.genet.41.110306.130119.

495 Mráček Z, Sturhan D, Reid A. 2003. *Steinernema weiseri* n. sp. (Rhabditida,
496 Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Europe. Syst. Parasitol. 56:37–
497 47. doi: 10.1023/A:1025531302519.

498 Nguyen KB, Půža V, Mráček Z. 2008. *Steinernema cholashanense* n. sp. (Rhabditida,
499 Steinernematidae) a new species of entomopathogenic nematode from the province of
500 Sichuan, Chola Shan Mountains, China. J. Invertebr. Pathol. 97:251–264. doi:
501 10.1016/j.jip.2007.06.006.

502 Ochman H, Davalos LM. 2006. The nature and dynamics of bacterial genomes. Science.
503 311:1730–1733. doi: 10.1126/science.1119966.

504 Ogier J-C et al. 2014. Attenuated virulence and genomic reductive evolution in the
505 entomopathogenic bacterial symbiont species, *Xenorhabdus poinarii*. Genome Biol. Evol. doi:
506 10.1093/gbe/evu119.

507 Ogier J-C et al. 2010. Units of plasticity in bacterial genomes: new insight from the
508 comparative genomics of two bacteria interacting with invertebrates, *Photorhabdus* and
509 *Xenorhabdus*. BMC Genomics. 11:568. doi: 10.1186/1471-2164-11-568.

510 Park D et al. 2009. Genetic analysis of xenocoumacin antibiotic production in the mutualistic
511 bacterium *Xenorhabdus nematophila*. Mol. Microbiol. 73:938–949. doi: 10.1111/j.1365-
512 2958.2009.06817.x.

513 Poinar GO Jr. 1990. Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. In:
514 Entomopathogenic nematodes in biological control. Gaugler, R & Kaya, HK, editors. CRC
515 Press: Boca Raton, FL pp. 23–61.

516 Poinar GO, Thomas GM. 1966. Significance of *Achromobacter nematophilus* Poinar and
517 Thomas (Achromobacteraceae: Eubacteriales) in the development of the nematode, DD-136 (
518 *Neoaplectana* sp., Steinernematidae). Parasitology. 56:385–390. doi:
519 10.1017/S0031182000070980.

520 Reverchon S, Rouanet C, Expert D, Nasser W. 2002. Characterization of indigoidine
521 biosynthetic genes in *Erwinia chrysanthemi* and role of this blue pigment in pathogenicity. J.
522 Bacteriol. 184:654–665.

523 Rosa JS, Cabral C, Simões N. 2002. Differences between the pathogenic processes induced by
524 *Steinernema* and *Heterorhabditis* (Nemata: Rhabditida) in *Pseudaletia unipuncta* (Insecta:
525 Lepidoptera). J. Invertebr. Pathol. 80:46–54.

526 Sheets JJ et al. 2011. Insecticidal toxin complex proteins from *Xenorhabdus nematophilus*:
527 structure and pore formation. J. Biol. Chem. 286:22742–22749. doi:
528 10.1074/jbc.M111.227009.

529 Sicard M et al. 2004. Stages of infection during the tripartite interaction between
530 *Xenorhabdus nematophila*, its nematode vector, and insect hosts. Appl. Environ. Microbiol.
531 70:6473–6480. doi: 10.1128/AEM.70.11.6473-6480.2004.

532 Spiridonov S, Krasomil-Osterfeld K, Moens M. 2004. *Steinernema jolietii* sp n. (Rhabditida:
533 Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from the American midwest. Russ. J.
534 Nematol. 12:85–95.

535 Stock SP, Goodrich Blair H. 2008. Entomopathogenic nematodes and their bacterial
536 symbionts : The inside out of a mutualistic association. Symbiosis. 46:65–75.

537 Sugar DR et al. 2012. Phenotypic variation and host interactions of *Xenorhabdus bovienii* SS-
538 2004, the entomopathogenic symbiont of *Steinernema jolietii* nematodes. Environ. Microbiol.
539 14:924–939. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02663.x.

540 Tailliez P, Pagès S, Ginibre N, Boemare N. 2006. New insight into diversity in the genus
541 *Xenorhabdus*, including the description of ten novel species. Int. J. Syst. Evol. Microbiol.
542 56:2805–2818. doi: 10.1099/ijs.0.64287-0.

543 Thomas GM, Poinar GO. 1979. *Xenorhabdus* gen. nov., a Genus of Entomopathogenic,
544 Nematophilic Bacteria of the Family *Enterobacteriaceae*. Int. J. Syst. Bacteriol. 29:352–360.
545 doi: 10.1099/00207713-29-4-352.

546 Varani AM, Siguier P, Gourbeyre E, Charneau V, Chandler M. 2011. ISSaga is an ensemble
547 of web-based methods for high throughput identification and semi-automatic annotation of
548 insertion sequences in prokaryotic genomes. Genome Biol. 12:R30. doi: 10.1186/gb-2011-12-
549 3-r30.

550 Vigneux F et al. 2007. The *xaxAB* Genes Encoding a New Apoptotic Toxin from the Insect
551 Pathogen *Xenorhabdus nematophila* Are Present in Plant and Human Pathogens. J. Biol.
552 Chem. 282:9571–9580. doi: 10.1074/jbc.M604301200.

553 Wang X, Wood TK. 2011. Toxin-antitoxin systems influence biofilm and persister cell
554 formation and the general stress response. Appl. Environ. Microbiol. 77:5577–5583. doi:
555 10.1128/AEM.05068-11.

556 Wang Y, Campbell JF, Gaugler R. 1995. Infection of Entomopathogenic Nematodes
557 *Steinernema glaseri* and *Heterorhabditis bacteriophora* against *Popillia japonica*
558 (Coleoptera: Scarabaeidae) Larvae. J. Invertebr. Pathol. 66:178–184. doi:
559 10.1006/jipa.1995.1081.

560

561

Figure legends

Figure 1. Venn diagram showing numbers of shared gene families (50% amino-acid identity, 80% alignment coverage) in the genomes of *Xb* CS03, *Xb* SS-2004, *X. nematophila* ATCC19061, *X. doucetiae* FRM16 and *X. poinarii* G6.

Figure 2. Functional classification of pseudogenized genes in *Xb* CS03 and *Xb* SS-2004.

A. Functional classification of *Xb* CS03 pseudogenes

B. Functional classification of *Xb* SS-2004 pseudogenes

Figure 3. *Xb* pan, core and flexibles genomes

A. Venn diagram showing numbers of shared gene families (80% amino-acid identity, 80% alignment coverage) in the genomes of *Xb* CS03 and *Xb* SS-2004.

The *Xb* core genome (2,673 gene families) includes the *Xenorhabdus* core genome (1,672 gene families common to *X. nematophila* ATCC19061, *X. doucetiae* FRM16 and *X. poinarii* G6) and the specific *Xenorhabdus bovienii* core genome (1,001 gene families).

B. Functional classification of coding sequences in *Xb* SS-2004 and *Xb* CS03 flexible genomes.

The coding sequences of each flexible genome have been classified into nine functional categories (Cell division, DNA/RNA metabolism, Host/Environment interaction, Metabolism, Phage/Recombination, Protein biosynthesis, Regulation, Transport and Unknown function according their annotation.

C. Specific host and environment interaction genes functions for the *Xb* SS-2004 (red) and *Xb* CS03 (green) flexible genomes.

The genes belonging to the flexible genome of *Xb* CS03 and *Xb* SS-2004 and encompassed into the “Host and environment interaction” category were classified according their annotation. The pseudogene number is indicated in lighter color.

Figure 4. *Xb* CS03 specific NRPS/PKS and nikomycin biosynthesis loci.

The figure shows the loci of *Xb* CS03 (bottom) and their synteny with the *Xb* SS-2004 genome (top).

A. NRPS/PKS loci that were likely acquired by *Xb* CS03 horizontal gene transfer.

B. Nikkomycin locus.

Figure 5. Genomic organization of *Xb* CS03 pseudogenized loci potentially involved involved in host interaction.

A. *tc* toxin loci of *Xb* SS-2004 (left) and *Xb* CS03 (right)

B. Putative adhesin locus.

The figure shows the loci of *Xb* CS03 (bottom) and their synteny with the *Xb* SS-2004 genome (top).

C. The *xaxAB* locus.

The figure shows the loci of *Xb* CS03 (bottom) and their synteny with the *Xb* SS-2004 genome (top).

Figure 6. Hemolytic activity of *Xb* CS03 is complemented by the *xaxAB* locus of *X. nematophila*.

A. Hemolytic activity of *Xb* SS-2004 (down) and *Xb* CS03 (top).

B. Hemolytic activity of CS03 pBBR1-MCS2 (left) and CS03 pBBMCS2-*xaxAB* (right)

Aliquots (20 µl) of cultures of the indicated strains were spotted onto sheep red blood agar plates and incubated at 28 °C. Zones of clearing were observed over a 15-h period.

Supplemental Data legends

Supplemental Table 1. List of coding sequences identified in the plasmid and the megaplasmid *Xb* CS03.

Supplemental Table 2. List of *Xb* CS03 and *Xb* SS-2004 and pseudogenes.

Supplemental Table 3. List of *Xb* CS03 and *Xb* SS-2004 core-genome, specific core-genome and flexible genomes coding sequences.

Supplemental Table 4. List of *Xb* CS03 and *Xb* SS-2004 regions of genomic plasticity.

Supplemental Table 5. List of *Xb* CS03 prophage loci.

Supplemental Table 6. List of *Xb* CS03 integrative conjugative elements.

Supplemental Table 7. List of *Xb* CS03 and *Xb* SS-2004 NRPS/PKS loci.

Tables

Table 1. Comparison of general genomic features of *Xenorhabdus bovienii* CS03 (*Xb* CS03) and *Xenorhabdus bovienii* SS-2004 (*Xb* SS-2004).

	<i>Xb</i> CS03			<i>Xb</i> SS-2004
Feature	<i>chromosome</i>	<i>megaplasmid</i>	<i>plasmid</i>	<i>chromosome</i>
Size (bp)	4635301	177250	8117	4225498
G+C content (%)	44.77	43.89	43.87	44.97
Coding sequences	4757	197	11	4362
Coding density (%)	83.63	82.82	62.95	84.92
Average CDS length (bp)	843.62	799	502.36	843.05
Average intergenic length (bp)	162.37	145.51	422	158.16
Repeated regions (%)	14.69	7.24	0	16.27
Pseudogenes	99	3	0	65
Insertion sequences ^a	298	29	0	369
Phagic genes ^b	454	119	0	450
Prophage loci ^b	10	1	0	8
rRNA operons	7	0	0	7
tRNAs	76	0	0	83
Accession number	FO818637	FO818638	FO818639	FN667741

^a Identified with the IS Saga tool (Varani et al. 2011).

^b Identified with Prophinder (Lima-Mendez et al. 2008)

Table 2. Antimicrobial activity of *X. bovienii* CS03 and SS-2004 against bacterial species associated to the insect or the nematode. Antimicrobial activity is given as the diameter of the clearing halo around the *X. bovienii* colony (in mm).

	<i>Xb</i> CS03	<i>Xb</i> SS-2004
<i>Proteus vulgaris</i>	0	0
<i>Serratia marcescens</i>	0	0
<i>Corynebacterium xerosis</i>	22	0
<i>Bacillus megatherium</i>	41	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	15-20	0
<i>Micrococcus luteus</i>	55	15
<i>Ochrobactrum intermedium</i>	0	0
<i>Pseudomonas putida</i>	15 ¹	0
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0	0

¹ Presence of colonies into the clearing halo

Figure 1

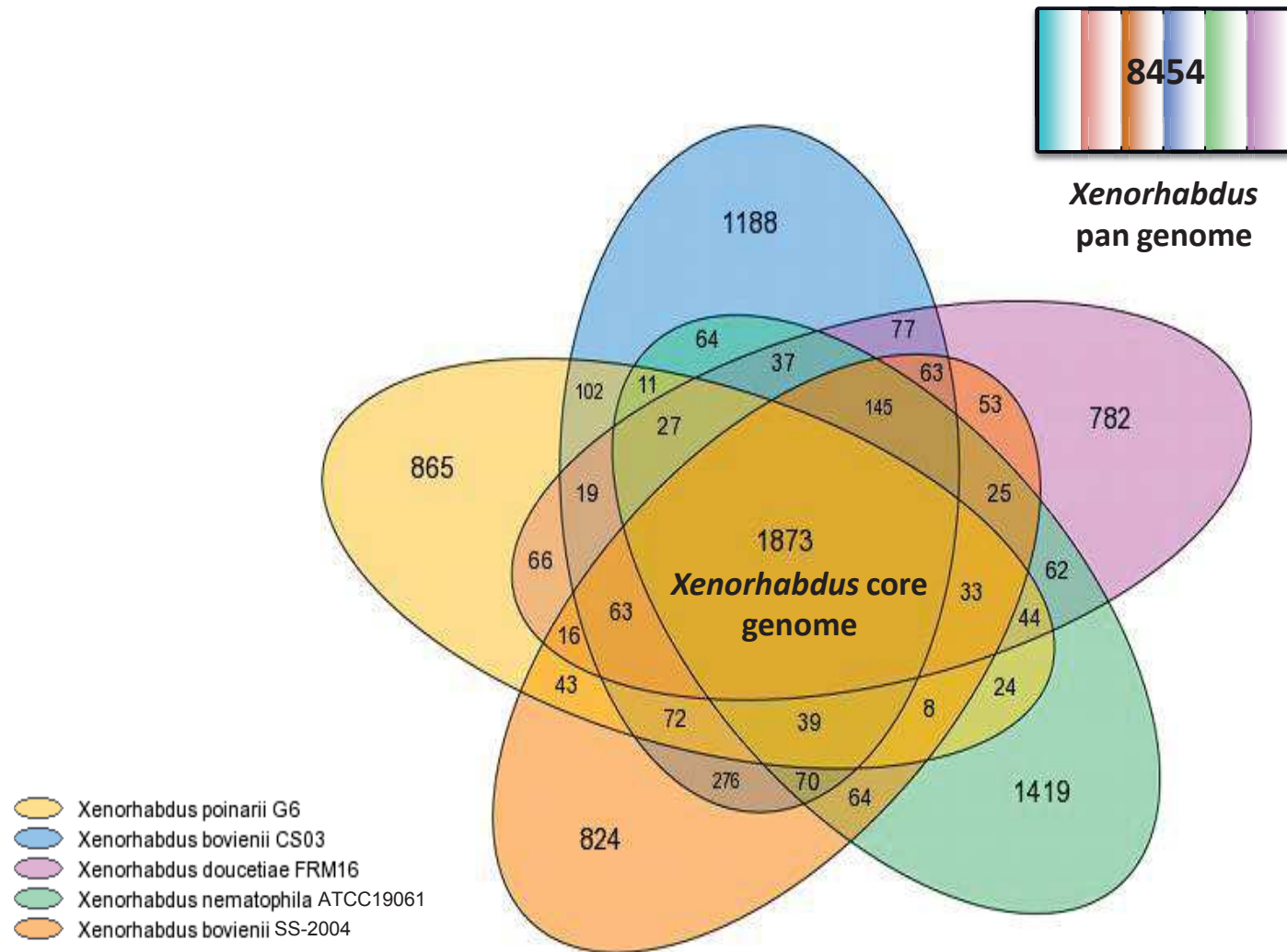
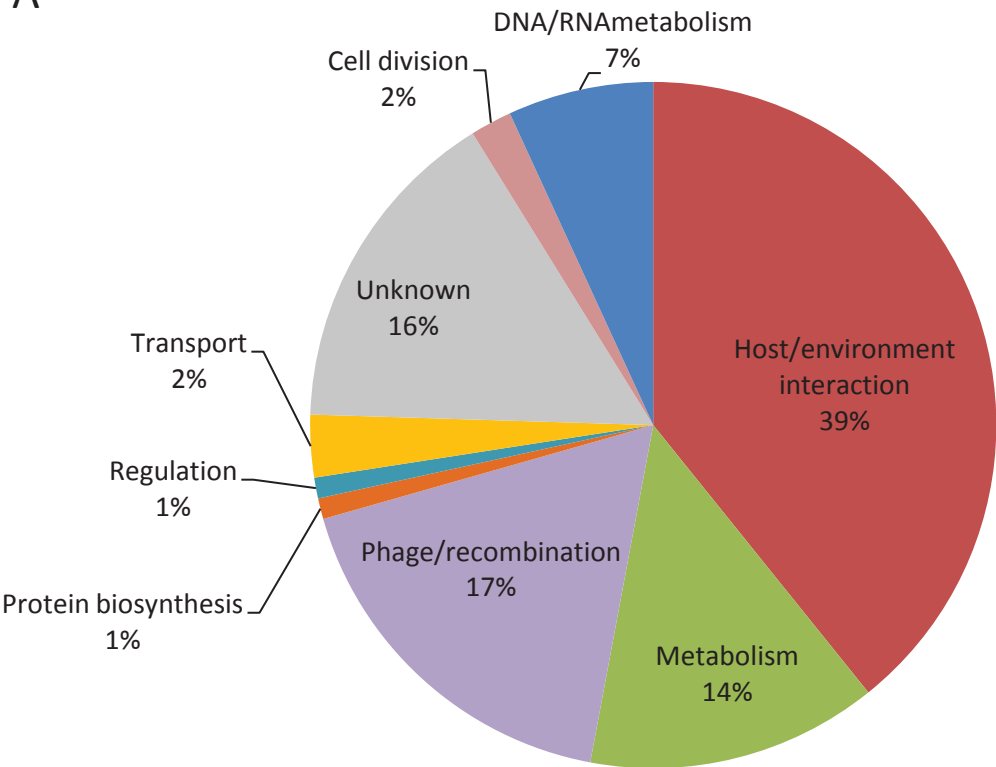


Figure 2.

A



B

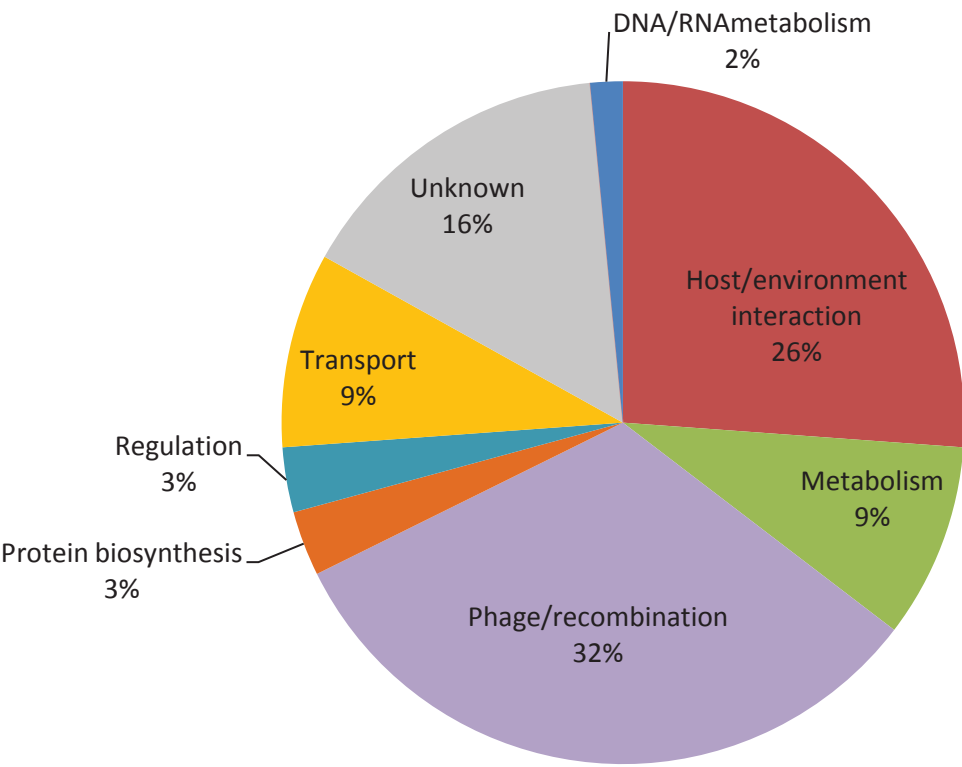
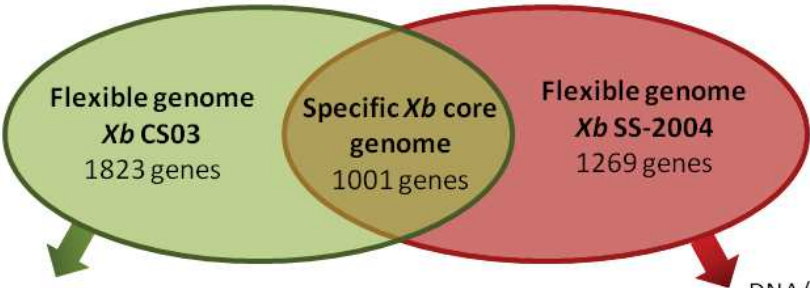
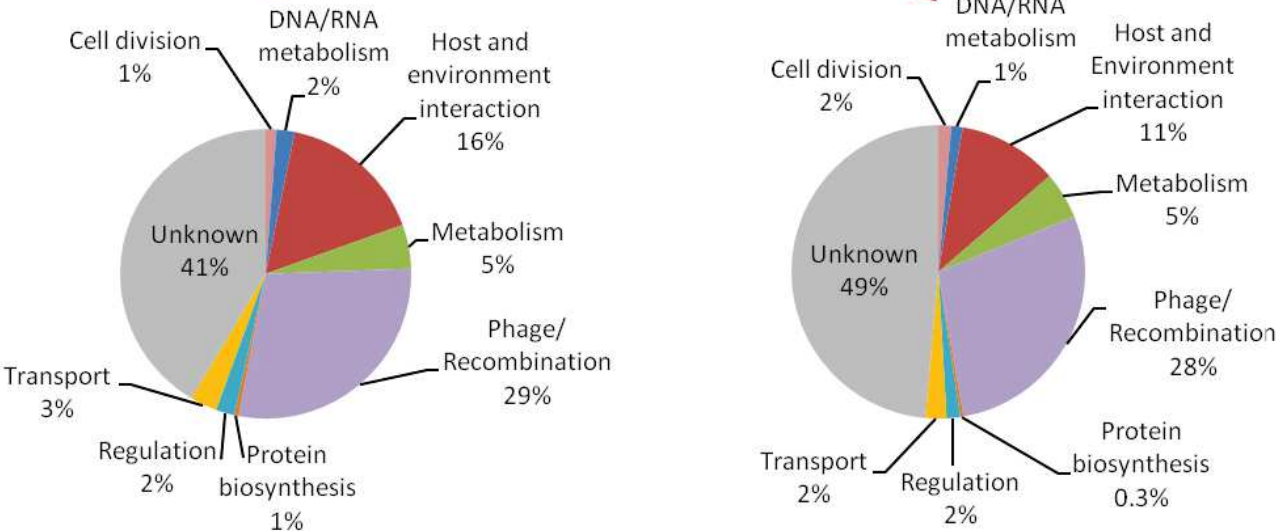


Figure 3

A



B



C

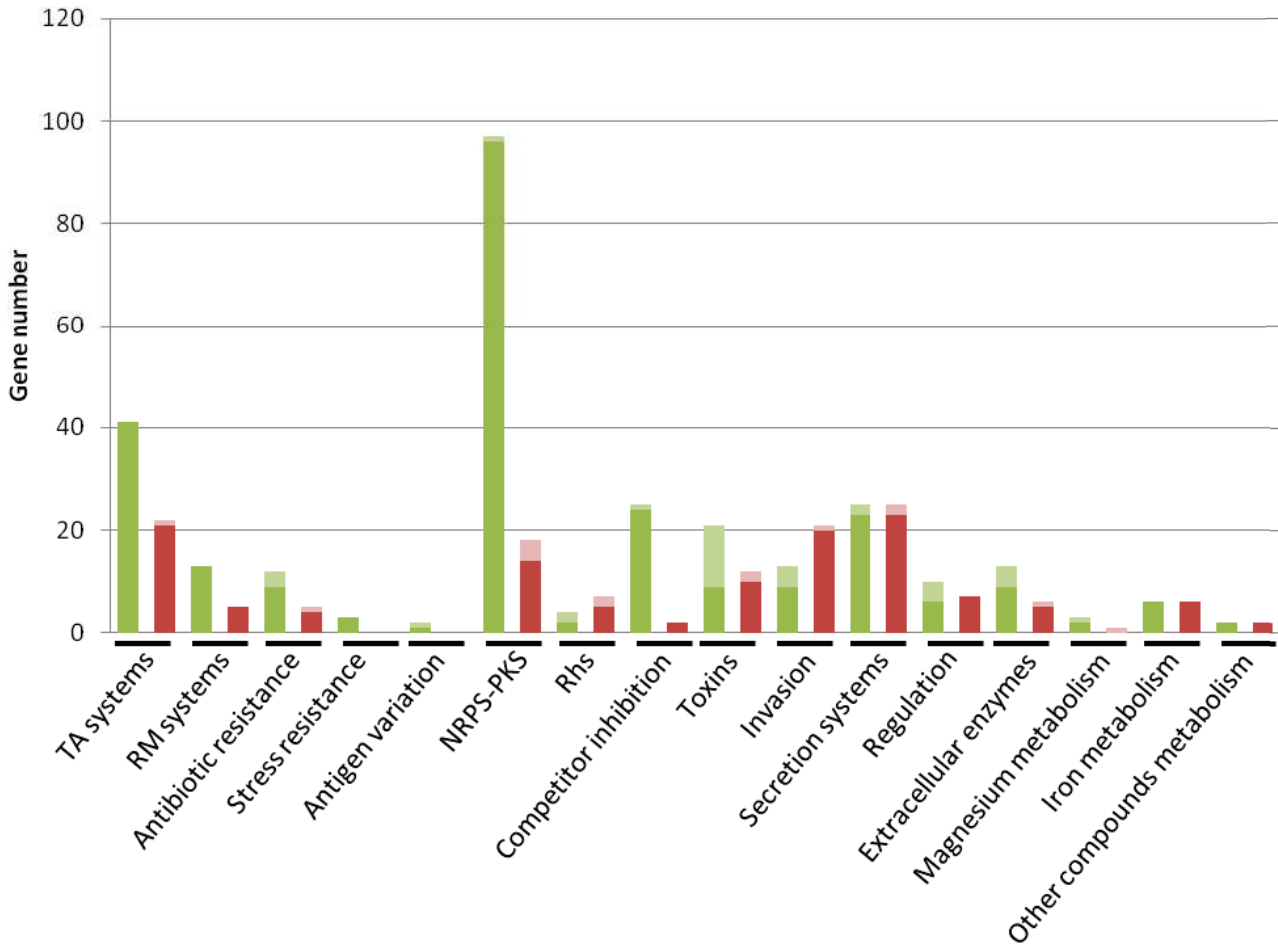
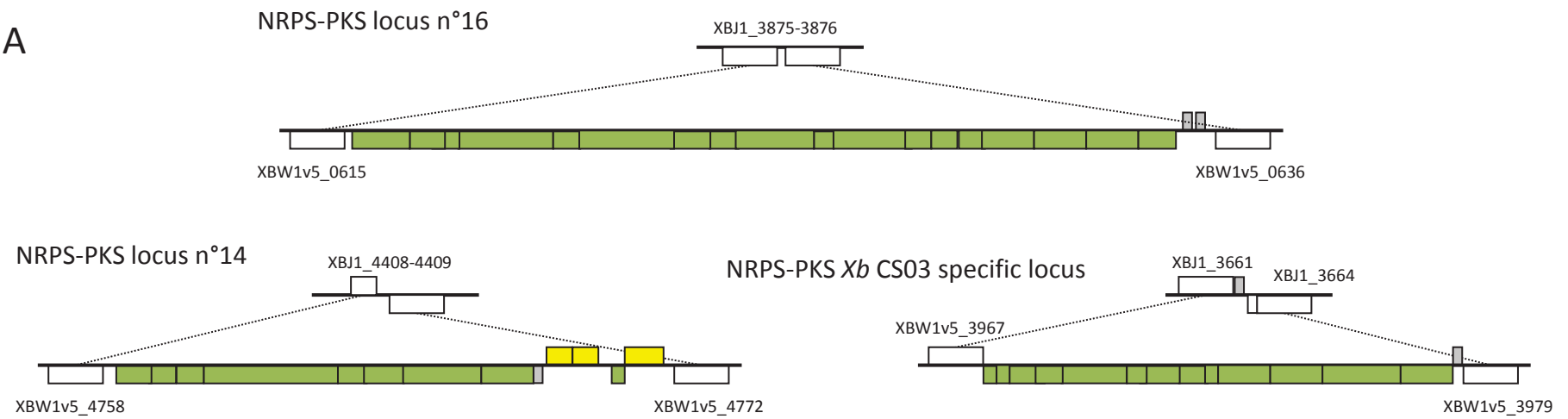
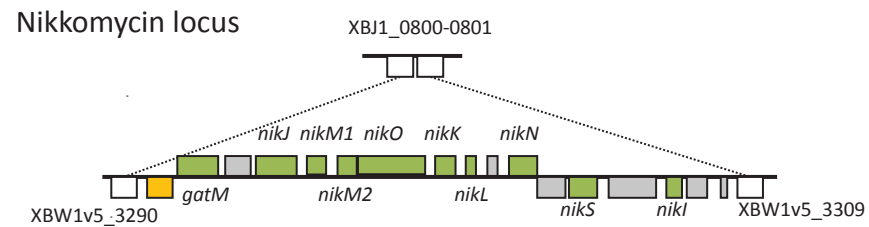


Figure 4.

A



B



- Antimicrobial compound synthesis gene
- Regulator
- Transposase/insertion sequence
- Protein of unknown function
- Core-genome gene

1000 bp

Figure 5

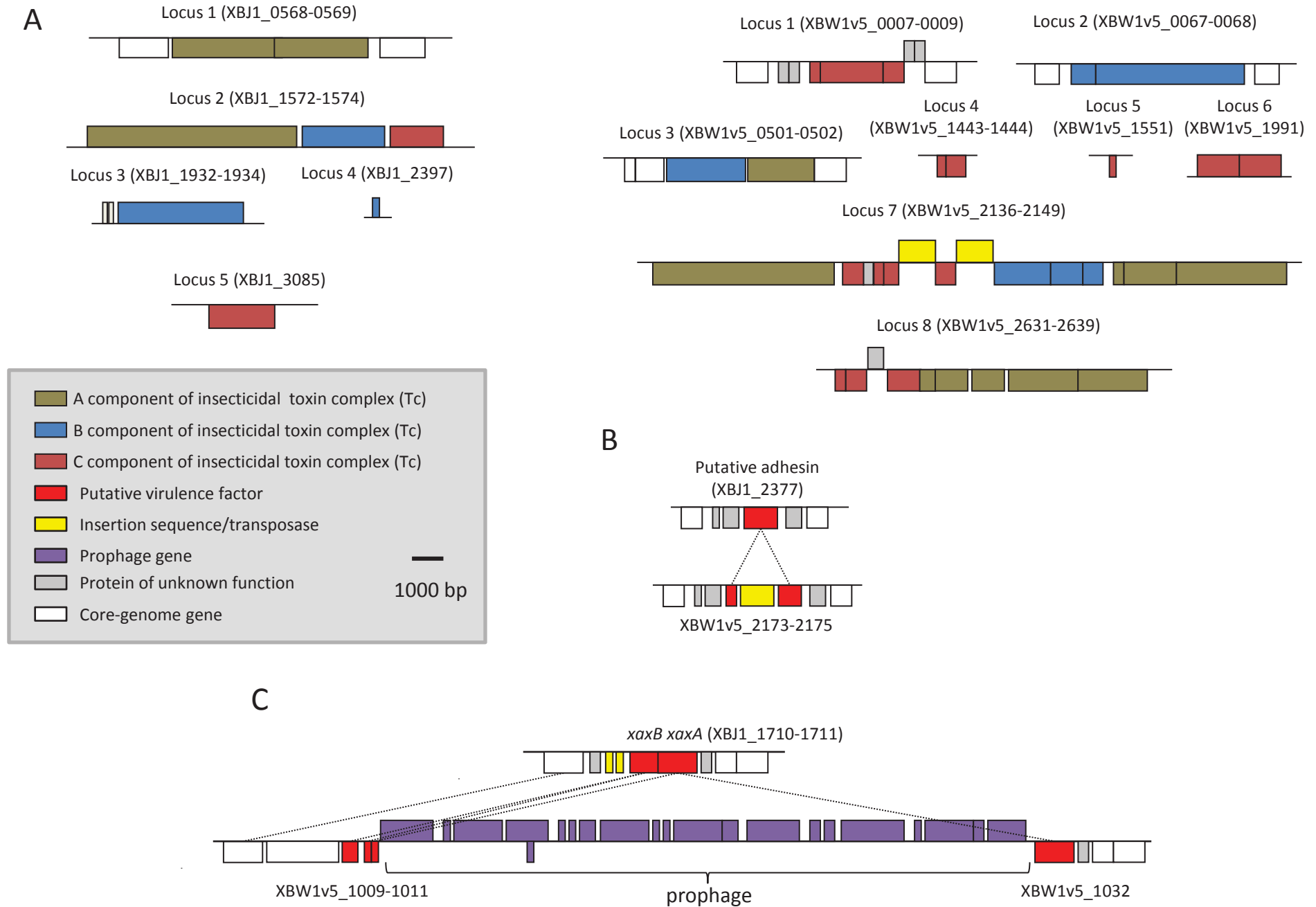
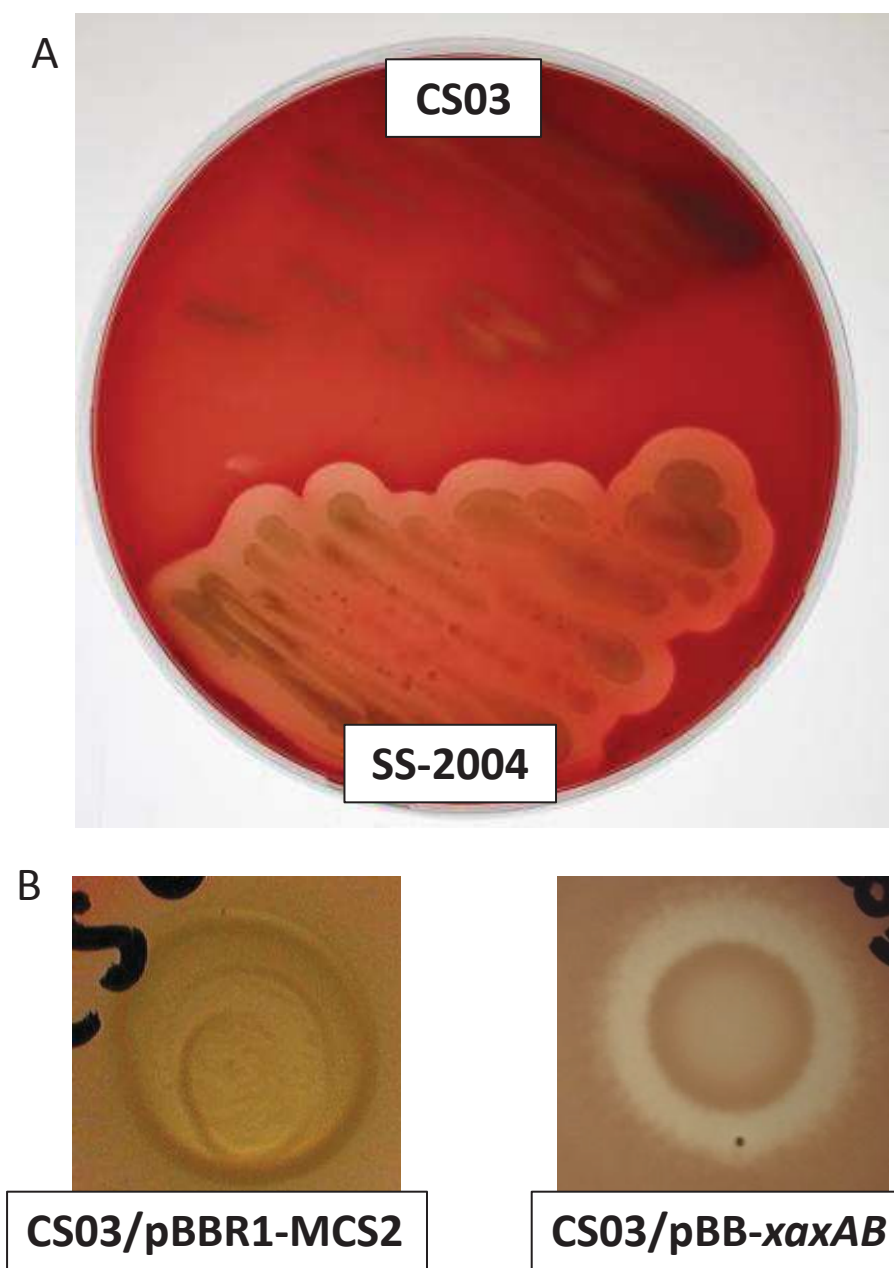


Figure 6



Conclusion du chapitre 3

Xb CS03 a donc suivi un chemin évolutif différent de *Xb* SS-2004. Ainsi, les associations *Steinernema-Xb* sont extrêmement variables en termes de complémentation des fonctions de virulence entre le nématode et la bactérie et d'évolution du symbionte bactérien. *Xb* CS03 représente un modèle d'étude de l'évolution du génome d'une bactérie symbiotique. Il peut également être employé, en comparaison avec des souches virulentes, dans la recherche et l'étude des facteurs de virulence.

Chapitre 4 : Recherche de nouveaux facteurs de virulence chez *Xenorhabdus* par génomique comparative et fonctionnelle

I- Introduction

Plusieurs facteurs de virulence ont déjà été décrits chez *X. nematophila* (voir Chapitre de présentation du modèle et Nielsen-LeRoux *et al.* (2012)). Cependant, les approches d'identification prenant en compte l'ensemble du génome sont restées rares : des mutagénèses par transposition avaient été réalisées sur *X. nematophila* (Xu *et al.*, 1991) ou *X. bovienii* T228 (Francis *et al.*, 1993), entraînant l'obtention de quelques mutants dont la virulence était atténuée. Une approche d'annotation rapide de la virulence (RVA, voir Chapitre 4 de l'introduction) par expression hétérologue dans *E. coli* avait été employée pour identifier des facteurs de virulence chez *Photorhabdus*.

Nous avons décidé de mettre en place une approche d'identification des facteurs de virulence de *Xenorhabdus* exploitant la diversité des génomes. Nous disposons en effet de deux génomes complets de souches non-virulentes (*Xb* CS03 et *Xp* G6), et de trois génomes complets de souches virulentes (*Xb* SS-2004, *X. doucetiae* FRM16 et *X. nematophila* ATCC19061) par injection dans l'insecte. En comparant les génomes de ces souches, nous pouvions donc espérer identifier les facteurs de virulence se situant dans toutes les souches virulentes par injection, dont la somme constituerait un *core-genome* de virulence chez *Xenorhabdus*. C'est la première fois qu'une telle comparaison pouvait être effectuée, car jusqu'au début de ce travail de thèse, seuls deux génomes de souches virulentes par injection (*Xb* SS-2004 et *X. nematophila* ATCC19061) étaient disponibles.

Dans un second temps, les gènes de virulence potentiels identifiés lors de la comparaison génomique ont été introduits dans nos deux souches non-virulentes, *Xp* G6 et *Xb* CS03. L'expression des facteurs de virulence potentiels en modèle hétérologue peut alors permettre un criblage de leur fonction.

II- Matériel et méthodes

A. Identification des gènes de virulence potentiels

L'outil Phyloprofile, disponible sur la plate-forme MaGe du Genoscope (www.genoscope.cns.fr/agc/microscope/home/index.php), a été utilisé pour identifier les gènes communs aux souches virulentes (*X. nematophila* ATCC 19061, *Xb* SS-2004 et *X. doucetiae* FRM16) et absents des souches non-virulentes (*Xb* CS03 et *Xp* G6). Nous avons considéré qu'un gène était présent dans les 3 souches virulentes s'il y avait au moins 30% d'identité sur 80% de la longueur des protéines codées par les différents gènes orthologues. Les gènes de souches virulentes qui étaient

également présents dans les souches non-virulentes virulentes (40% d'identité sur au moins 80% de la longueur des protéines codées) ont été éliminés lors de l'analyse.

B. Validation fonctionnelle

1. Clonage des gènes candidats dans le plasmide pBBR1-MCS2 et conjugaison dans *Xb* CS03 et *Xp* G6

Les gènes de virulence potentiels ont été clonés sous le contrôle du promoteur P_{lac} , qui confère chez les bactéries du genre *Xenorhabdus* une expression constitutive (le gène du répresseur de l'opéron, *lacI*, étant absent du génome). Pour ceci, les gènes de virulence potentiels ont tout d'abord été amplifiés par PCR (enzyme iProof High-Fidelity DNA Polymerase [Bio-Rad]) à partir d'ADN génomique de *X. nematophila* ou de *X. doucetiae* FRM16, en utilisant les amorces décrites dans le tableau annexe 1. Les produits d'amplification par PCR et le plasmide mobilisable pBBR1-MCS2 (Kovach *et al.*, 1995) ont ensuite été hydrolysés par les enzymes de restriction *Sall* et *XbaI* ou *Sall* et *EcoRI* (Roche) selon les gènes candidats clonés (voir Tableau annexe 1), puis ligaturés. Le plasmide pBBR1-MCS2 contenant le locus *xaxAB* a été obtenu comme décrit dans l'article 3. Les plasmides recombinants ont ensuite été introduits dans *Escherichia coli* XL1-blue (Stratagene) pour être amplifiés. Après extraction et séquençage des inserts (Millegen, France), les plasmides recombinants ont été introduits dans les souches non-virulentes *Xb* CS03 et *Xp* G6 par conjugaison avec *E. coli* WM3064 (Paulick *et al.*, 2009) selon le protocole décrit par Givaudan & Lanois (2000). L'ensemble des plasmides, des souches d'*E. coli* et de *Xenorhabdus* utilisées et construits dans cette partie sont décrites dans le Tableau annexe 2.

2. Tests phénotypiques et biochimiques

La croissance des souches transconjugantes en milieu LB contenant 20 µg/mL (pour les souches *Xb* CS03 transconjugantes) ou 40 µg/mL (pour les souches *Xp* G6 transconjugantes) de kanamycine (Sigma) a été vérifiée. Pour ceci, une préculture de chaque souche transconjugante (~16h de croissance) diluée au 1/1000 a été distribuée dans les puits d'une plaque 96 puits. L'absorbance à 600 nm de la culture (28°C avec agitation) a été mesurée toutes les 30 minutes par un lecteur de microplaques Infinte M200 (TECAN). L'activité hémolytique, lipasique (dégradation de Tween) et lécithinasique, la présence d'une activité antimicrobienne ciblant *Micrococcus luteus* et la mobilité des transconjugants ont été testées en suivant le protocole décrit précédemment (Boemare *et al.*, 1997). Le profil de nos transconjugants en galeries API 20E (BioMérieux) a été réalisé selon les instructions du fabricant.

3. Vérification de l'expression constitutive des inserts dans les transconjugants

L'ARN total des souches transconjugantes été extrait de cultures en phase stationnaire à l'aide du kit RNAeasy (Qiagen), et les ADN complémentaires (ADNc) ont été synthétisés à partir de ~500 ng d'ARN purifié en utilisant l'enzyme Super Script II Reverse Transcriptase (Invitrogen) et des hexamères aléatoires (100 ng/μl, Applied Biosystems), comme décrit dans Jubelin *et al.*, (2013). Nous avons ensuite utilisés les ADNc de chaque transconjugant comme matrice pour rechercher par PCR l'expression de l'insert contenu dans le pBBR1-MCS2, en utilisant les amorces de clonage décrites dans le tableau annexe 1 et les amorces GR79bis Xeno_F (5'-TGG CTG AAA TAA CYT ATA CCA ATG AYG AT-3') et GR79bis Xeno_R (5'-CTG GCT ATC TCC RCA CCT TGT TT-3') pour les transconjugants contenant l'insert *xaxAB*.

4. Recherche d'une activité hémolytique en milieu liquide

L'activité hémolytique des surnageants de culture des souches *Xb* CS03/pBB-*xaxAB* et *Xp* G6/pBB-*xaxAB* sur des hématies de mouton et de lapin a été recherchée comme décrit dans Brillard *et al.* (2001). Brièvement, des aliquots de 1mL de cultures (100 mL de LB, 28°C avec agitation) ont été prélevés après 20, 30 et 48h. Les surnageants ont été obtenus par centrifugation (3 min, 13 000 rpm) et filtration (0,22 μm) de ces aliquots, puis stockés à -20°C. 50 μL de surnageant ont ensuite été mis en contact avec 25 μL d'hématies de mouton ou de lapin (5%, BioMérieux) lavées au PBS. Après une incubation de 1h à 37°C, les échantillons ont été centrifugés (5 min, 4000 rpm) et les surnageants ont été dilués au ¼ afin de lire leur absorbance à 540 nm (lecteur de microplaques Infinite M200, TECAN). Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité hémolytique par rapport à un témoin positif (50 μL d'eau ultra-pure, 50 μL d'hématies) dont l'absorbance est ramenée à 100% de lyse.

5. Recherche d'une activité protéolytique

L'activité protéolytique sur azocaséine a été recherchée selon un protocole adapté de Cabral *et al.*, (2004). Brièvement, 50μL de culture en phase stationnaire (24h, 5mL de LB) ont été mis en contact sur la nuit (~16h) avec 80 μL d'une solution d'azocaséine (Azocaséine Sigma à 2% dans du Tris HCl 50 mM, pH 8,5). Le lendemain, les protéines ont été précipitées par l'ajout de 400 μL d'acide trichloroacétique (10%). Après 10 minutes d'incubation à 4°C et centrifugation (13 000 rpm, 10 min, 4°C), 500 μL de NaOH (1N) ont été ajoutés aux surnageants, et l'absorbance à 440 nm a été lue grâce à un spectrophotomètre.

Les zymogrammes sur gélatine ont été réalisés selon le protocole adapté de Le Roux *et al.*, (2007). Brièvement, des surnageants de culture et des extraits cellulaires ont été obtenus de cultures en phase stationnaire tardive (24h, 5mL de LB). Pour obtenir les extraits cellulaires, les cultures ont été centrifugées (10 000 rpm, 15 min), puis les culots ont été repris dans 1 mL de PBS et lysés par sonication (sonicateur Vibra-Cell 75042 [Bioblock], 3x15 sec, amplitude 38%). Les échantillons de

surnageants de culture et d'extraits cellulaires ont été dilués afin de déposer ~20 µg de protéine dans chaque puits du gel SDS-PAGE contenant la gélatine (20 mg/gel).

6. Surproduction de la protéine codée par XNC1_2096

Le gène XNC1_2096 a été amplifié par PCR (enzyme iProof High-Fidelity DNA Polymerase [Bio-Rad]) en utilisant les amorces N-ter_*NdeI*_2096LP et N-ter-*EcoRI*_2096RP décrites dans l'annexe 1. L'amplicon a ensuite été hydrolysé par les enzymes de restriction *NdeI* et *EcoRI* et cloné dans les sites correspondants du plasmide pET28a. Le pET28a/XNC1-2096 obtenu a été introduit dans la souche *E. coli* BL-21 PlysS afin de surproduire la protéine codée par le gène XNC1_2096. Pour ceci, les bactéries contenant le pET28a/XNC1_2096 ont été cultivées à 37°C dans 200 mL de LB jusqu'à atteindre une DO₆₀₀ de 0,2, puis 0,5 mM d'IPTG ont été ajoutés pour induire la surexpression de la protéine tagguée. Après 24h d'induction, la protéine codée par XNC1_2096 a été purifiée sur une colonne d'affinité au nickel (NiNTA agarose, Qiagen) permettant de retenir la protéine recombinante par son tag Histidine, en suivant les instructions du fabricant.

7. Tests pathologiques

La virulence des souches transconjugantes a été testée comme précédemment décrit (Givaudan & Lanois, 2000; Bisch *et al.*, 2014).

8. Interaction avec les hémocytes de *S. littoralis*

Des gouttes d'hémolymphes de larves de *Spodoptera littoralis* au stade L6+3 ont été déposées dans les puits d'une plaque à 12 puits contenant 500 µL de tampon anticoagulant (tampon citrate-EDTA, KCl 69mM, NaCl 37mM, NaHCO₃ 2mM, D(+)-Glucose 100mM, citrate de tripotassium 30mM, acide citrique 26 mM, Na₂-EDTA 10mM, pH 4.6, 420 mOsm, van Sambeek & Wiesner (1999)). Après 15 minutes d'incubation permettant l'adhérence des hémocytes au fond du puits, un lavage au PBS a été réalisé, puis 1 mL de TC-100 (BioWhittaker) a été ajouté à chaque puits et les hémocytes ont été incubés (~16h, 23°C). Enfin, environ 10⁵ bactéries diluées dans du TC-100 ont été ajoutées dans chaque puits. Après 2h d'incubation à 23°C, les puits ont été lavés au PBS, puis les cellules ont été colorées par incubation avec 20µL de bleu Trypan pendant 5 minutes avant observation au microscope inversé (grossissement 400). Les pourcentages de mortalité ont été calculés comme le rapport entre le nombre de cellules ayant un noyau coloré par le bleu Trypan (cellules mortes) et le nombre total de cellules observées dans trois champs.

9. Effet des bactéries recombinantes sur l'émergence du nématode

Nous avons également examiné si les souches *Xb* CS03 transconjugantes aidaient au développement du nématode. Pour ceci, 10 larves de *S. littoralis* ont été infestées avec les nématodes *Steinernema weiseri* aposymbiotiques précédemment obtenus (voir III du Chapitre 2). 24h après l'infestation, 10³

Tableau 2. Gènes identifiés lors de l'analyse Phyloprofile absents chez les souches non-virulentes et présents chez les souches virulentes. Les pourcentages d'identité en acides aminés avec le produit du gène cloné sont indiqués entre parenthèses.

Gène cloné	Orthologue chez			Protéine codée
	<i>X. nematophila</i>	<i>X. bovienii</i> SS-2004	<i>X. doucetiae</i>	
XNC1_3766 (<i>xaxA</i>) XNC1_3767 (<i>xaxB</i>)	-	XBJ1_1711 (73,63%) XBJ1_1710 (68,86%)	XDv4_0809 (81,68%) XDv4_0810 (69,71%)	Hémolysine XaxAB
XDv4_0555 (<i>pagC</i>)	XNC1_3735 (59,38%)	XBJ1_0486 (61,73%)	-	Protéine de membrane externe PagC (44,04% d'identité avec la protéine PagC de <i>Salmonella typhimurium</i>)
XNC1_0202 (<i>phd</i>) XNC1_0203 (<i>doc</i>)	-	XBJ1_4379; XBJ1_4384 (98,63%) XBJ1_4380 (99,24%)	XDv4_0112 (95,89%) XDv4_0111 (97,73%)	Systèmes toxine-antitoxine 42,47% d'identité avec la protéine Phd d' <i>Escherichia coli</i> K12 53,78% d'identité avec la protéine Doc d' <i>E. coli</i> K12
XDv4_0556 (<i>mazF</i>) XDv4_0557 (<i>mazE</i>)	-	-	-	68,47% d'identité avec la protéine MazF d' <i>E. coli</i> K12 51,32% d'identité avec la protéine MazE d' <i>E. coli</i> K12
XDv4_0560 (<i>mazF</i> -like) XDv4_0561 (antitoxine associée)	XNC1_0532 (86,29%) XNC1_0530 (88,89%)	XBJ1_1577 (88,04%) XBJ1_1578 (84,44%)	-	32,11% d'identité avec la protéine MazF d' <i>E. coli</i> K12
XNC1_2244 XNC1_2245	-	XBJ1_2348 (75,54%) XBJ1_2349 (74,58%)	XDv4_2135 (81,33%) XDv4_2133 (75,26%)	22,76% d'identité avec la 2,4-dichlorophenoxyacétate dioxygénase de <i>Burkholderia sp.</i> protéine hypothétique conservée
XNC1_2075	-	XBJ1_2255 (83,33%)	XDv4_1943 (91,67%)	Protéines de fonction inconnue
XNC1_2096	-	XBJ1_1225 (53,81%)	XDv4_0801 (52,38%)	
XNC1_2207	-	XBJ1_2371 (70,27%)	XDv4_2098 (66,22%)	
XNC1_3102	-	XBJ1_0982 (36,06%)	XDv4_2870 (37,21%) XDv4_3457 (36,04%)	
XNC1_3196	-	XBJ1_2994 (72,45%)	XDv4_2620 (77,55%)	

bactéries transconjugantes *Xb* CS03 contenant le pBBmcs2 avec ou sans insert ont été injectées dans les insectes. La mortalité des chenilles ainsi que l'émergence des nématodes ont ensuite été observées, et nous avons calculé les succès parasites et reproducteurs comme précédemment décrits (voir Article n°2).

III- Résultats

A. Identification de gènes de virulence par comparaison génomique

Dans un premier temps, nous avons identifié 59 gènes partagés par les trois souches virulentes et absents chez les souches non-virulentes. Après élimination de certains gènes (présence ou absence mal prédite par l'outil PhyloProfile, gènes largement distribués dans des espèces bactériennes non pathogènes comme *E. coli* K12, régions phagiques répétées dont le clonage poserait problème), nous avons retenu 18 gènes, répartis en 12 régions potentielles de virulence. Les gènes mis en évidence possèdent des fonctions diverses, qui peuvent se regrouper en 5 grandes familles (Tableau 2) :

- le gène de l'hémolysine XaxAB (voir I-B. de la description du modèle *Xenorhabdus*), dont le rôle dans la virulence reste mal connu. Chez *X. nematophila*, les mutants dans lesquels le locus *xaxAB* a été inactivé sont capables de tuer les insectes de la même façon que la souche sauvage (Lanois *et al.*, 2008).
- le gène *pagC*, qui code est une protéine de la membrane externe, partagée par de nombreuses bactéries virulentes. Chez *Salmonella* et *Photorhabdus*, elle est impliquée dans la résistance au système du complément et permet la résistance à la phagocytose chez *Salmonella* (Nishio *et al.*, 2005; Miller *et al.*, 1992; Mouammine *et al.*, 2014). De plus, la surproduction de PagC chez *Salmonella* est associée à la formation de vésicules de membrane externe qui sont impliquées dans l'adressage de facteurs de virulence au cœur des cellules infectées (Kitagawa *et al.*, 2010).
- des loci codant des systèmes toxine-antitoxine *phd/doc* et *mazEF* (voir chapitre I des résultats). La toxine Doc est capable de bloquer la traduction en se liant à la sous-unité 30S du ribosome (Liu *et al.*, 2008). La toxine MazF, quant à elle, clive les ARN messagers (Zhang *et al.*, 2003).
- un gène codant une 2,4-dichlorophenoxyacétate dioxygénase potentielle. Cette protéine pourrait être impliquée dans le catabolisme des cycles aromatiques. Elle pourrait donc interférer avec les substrats aromatiques de la phénoloxydase de l'insecte bien que son rôle reste actuellement inconnu.

Tableau 3. Phénotypes des transconjugants Xb CS03.

Test phénotypique	CS03/ pBBR1- MCS2	CS03/ pBB- <i>xaxAB</i>	CS03/ pBB-2096	CS03/ pBB- <i>pagC</i>	CS03/ pBB- <i>phd/doc</i>	CS03/ pBB- 2075	CS03/pBB - <i>mazEF</i>	CS03/pBB - <i>mazEF</i> - like	CS03/ pBB- 3102	CS03/pBB - 2207	CS03/pBB -3196
Hémolyses sur boîte (gélose au sang de mouton)	-	+	Légère	-	-	-	-	-	-	-	-
Activité lipase											
Tween 20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tween 40	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tween 60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tween 80	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tween 85	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lécithinase (patch sur boîte)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Profil en galerie API	Profil sauvage	Profil sauvage	Gélatinase +	Profil sauvage	Profil sauvage	Profil sauvage	Profil sauvage	Profil sauvage	Profil sauvage	Profil sauvage	Profil sauvage
Activité antimicrobienne (<i>Micrococcus luteus</i>)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mobilité	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Interaction avec les hémocytes	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Tests pathologiques (10 ⁴ bactéries/insecte) <i>Galleria mellonella</i> <i>Spodoptera littoralis</i>	ATT AV	ATT AV	ATT AV	ATT AV	ATT AV	ATT AV	ATT AV	ATT AV	ATT AV	ATT AV	ATT AV
Résistance à la polymyxine (peptide antimicrobien)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tableau 4. Phénotypes des transconjugants Xp G6.

Test phénotypique	G6/pBBR1- MCS2	G6/pBB- <i>xaxAB</i>	G6 pBB- 2096	G6/pBB- <i>pagC</i>	G6/pBB- <i>phd/doc</i>	G6/pBB- 2075	G6 /pBB- <i>mazEF</i>	G6/pBB- <i>mazEF</i> - like	G6/pBB- 3102	G6/pBB- 2207	G6/pBB- 3196
Hémolyses sur boîte (gélose au sang de mouton)	-	Partielle	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Activité lipase											
Tween 20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tween 40	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tween 60	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tween 80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tween 85	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lécithinase (patch sur boîte)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Profil en galerie API	Profil sauvage	Profil sauvage	Profil sauvage	Profil sauvage	Profil sauvage	Profil sauvage	Profil sauvage	Profil sauvage	Profil sauvage	Profil sauvage	Profil sauvage
Activité antimicrobienne (<i>Micrococcus luteus</i>)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mobilité	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tests pathologiques (10 ⁴ bactéries/insecte) <i>Galleria mellonella</i> <i>Spodoptera littoralis</i>	AV/ATT AV	AV/ATT AV	ND AV	ND AV	ND AV	ND ND	ND ND	ND ND	ND ND	ND ND	ND ND
Résistance à la polymyxine (peptide anti-microbien)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ : positif ; **-** : négatif ; **ND** : non déterminé ; **AV** : souche non-virulente ; **ATT** : souche atténuée

- de nombreux gènes codant des protéines de fonction inconnue ont enfin été mis en évidence par l'analyse Phyloprofile. Certaines de ces protéines sont partagées par d'autres bactéries pathogènes comme *Yersinia* ou les *Escherichia coli* pathogènes.

B. Clonage des gènes candidats

Nous avons cloné nos gènes candidats dans pBBR1-MCS2, un plasmide à moyen nombre de copies, qui comporte un promoteur P_{lac} permettant l'expression constitutive de ces gènes dans *Xenorhabdus*, qui ne contient pas le répresseur *lacI* de cet opéron. Nous avons ensuite introduit les plasmides recombinants par conjugaison dans les souches non-virulentes *Xp* G6 et *Xb* CS03 par conjugaison. Aucun transconjugant contenant l'insert XNC1_2244-2245, qui code une dioxygénase potentielle et une protéine de fonction inconnue, n'a pu être obtenu. L'une des deux protéines pourrait donc avoir un effet toxique sur nos souches de *Xenorhabdus* non-virulentes, et le clonage devra être refait en utilisant un promoteur inductible pour cet insert afin que la protéine toxique ne s'exprime pas constitutivement.

Après le clonage, nous avons vérifié par RT-PCR sur l'ARN messager des transconjugants obtenus que l'expression des inserts *xaxAB*, XNC1_2096, *pagC* et *phd/doc* dans *Xb* CS03 et *Xp* G6 était bien constitutive. Dans le cas des inserts XNC1_2096 et *phd/doc*, la bande amplifiée par PCR à partir des ADN complémentaires de *Xp* G6 était de plus faible intensité, ce qui laisse à penser que l'expression de ces inserts dans *Xp* G6 était moins forte que dans *Xb* CS03. Nous avons également vérifié la croissance de nos souches transconjugantes en milieu LB, qui était comparable à celle de la souche sauvage.

C. Criblage fonctionnel des souches recombinantes

Nous avons criblé nos transconjugants pour un certain nombre de phénotypes liés à la virulence (activité hémolytique, lipasique, lécithinasique, mobilité, résistance aux peptides antimicrobiens...). Nous avons également recherché si la virulence des souches *Xp* G6 et *Xb* CS03 était complémentée par les inserts.

Les résultats de ce criblage des gènes de virulence potentiels identifiés par l'analyse Phyloprofile sont résumés dans les Tableaux 3 et 4. Aucune différence dans les activités lipase, lécithinase, la mobilité, l'activité antimicrobienne ou la résistance à la polymyxine (un peptide antimicrobien) n'a pu être mise en évidence entre les souches exprimant ou non un gène de virulence potentiel. Lors de l'injection de 10^4 bactéries par insecte, les souches sauvages ainsi que tous les transconjugants de *Xb* CS03 et *Xp* G6 étaient non-virulents sur *S. littoralis*. Sur *G. mellonella*, les souches sauvages comme les transconjugants étaient non-virulents ou avaient une virulence atténuée.

Figure 17. Comparaison des *loci xaxAB* au sein des souches virulentes et non-virulentes. Le GC% moyen chez *Xenorhabdus* est de ~45%.

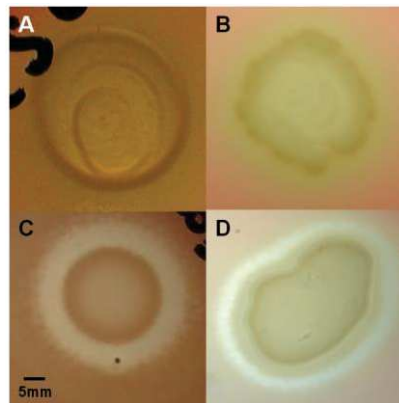
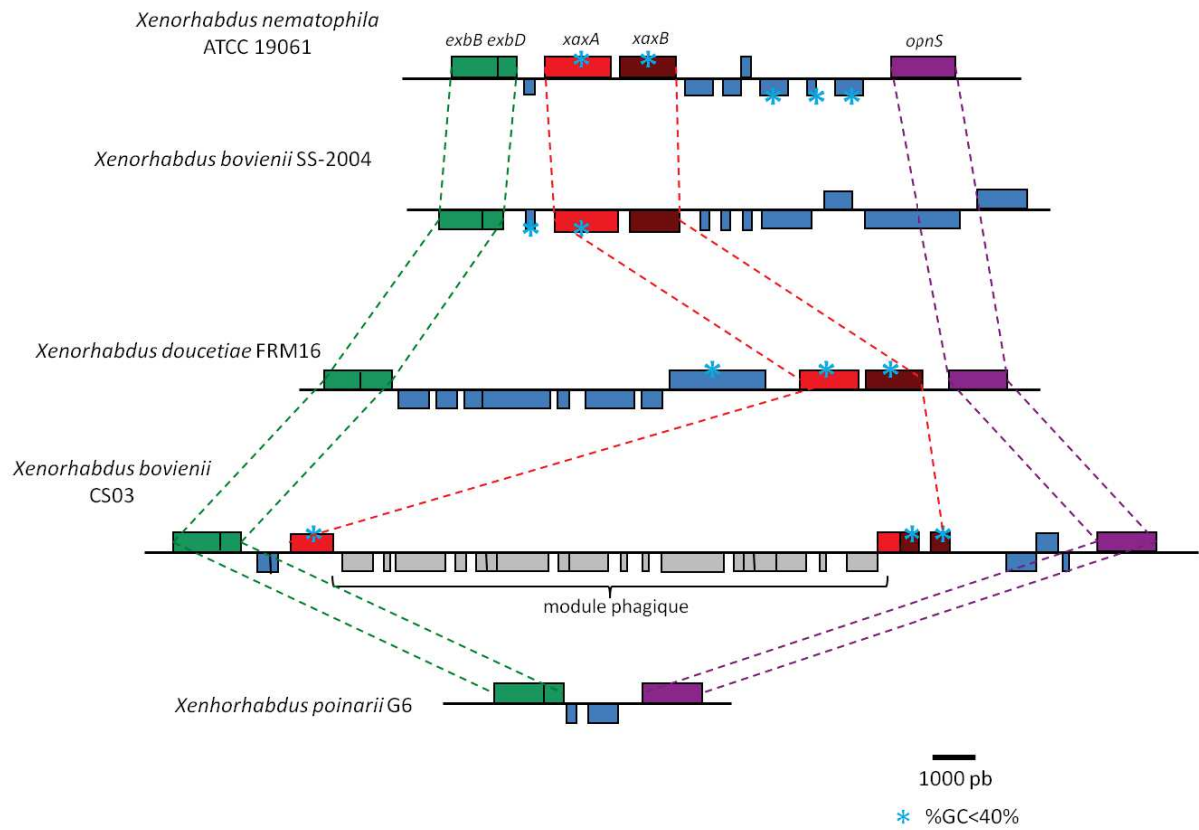


Figure 18. Activité hémolytique observée suite à l'introduction de *xaxAB* chez *Xb* CS03 et *Xp* G6. (A) *Xb* CS03 pBBR1_MCS2 ; (B) *Xp* G6-pBBR1-MCS2 ; (C) *Xb* CS03/pBB-*xaxAB* ; (D) *Xp* G6/pBB-*xaxAB*. L'hémolyse est visible sous la forme d'un halo clair qui entoure la colonie bactérienne. Chez *Xp* G6/pBB-*xaxAB*, on observe directement autour de la colonie une zone non hémolysée et le halo d'hémolyse est distant : l'hémolyse est dite « Farmer » (Farmer *et al.*, 1989). Ces données sont issues du stage de master 2 de R. El Hajj (2011).

Par la suite, nous avons donc choisi de nous concentrer sur les deux gènes dont l'introduction dans nos souches non-virulentes entraînait un phénotype différent de celui de la souche ne contenant pas l'insert :

- Le locus de l'hémolysine *xaxAB* qui confère une activité hémolytique totale ou partielle chez *Xb* CS03 et *Xp* G6, respectivement.
- Le gène de fonction inconnue XNC1_2096 qui entraîne l'apparition d'une activité gélatinase en galerie API chez *Xb* CS03.

D. Le locus *xaxAB*

1. Contexte génomique du locus *xaxAB*

Le contexte génomique du locus *xaxAB* est conservé entre les différentes souches de *Xenorhabdus* (Figure 17). Cependant, chez *Xb* CS03, le gène *xaxA* est interrompu par un module phagique et le gène *xaxB* est fragmenté. Les fragments continuent cependant d'être exprimés (Article 3), ce qui suggère une pseudogénisation récente. Chez *Xp* G6, le locus *xaxAB* est complètement absent et nous avons montré que cette absence était due à une délétion du locus (Article 1).

Le GC% de *xaxAB* est divergent du GC% moyen du reste du génome du genre *Xenorhabdus*, qui est d'environ 45%. Le locus *xaxAB* semble donc avoir été acquis par transfert horizontal. Chez *Xenorhabdus*, le génome flexible s'organise en modules dont la position peut varier d'une souche à l'autre (Ogier *et al.*, 2010). Le locus *xaxAB* constitue un module de deux gènes réarrangé chez les deux souches non-virulentes *Xp* G6 et *Xb* CS03. Des homologues de *xaxAB* se retrouvent également chez d'autres espèces pathogènes comme *Photorhabdus luminescens*, *Yersinia enterocolitica* ou *Pseudomonas syringae*, ce qui montre que ce module s'est fortement propagé par transfert horizontal.

2. Complémentation de l'activité hémolytique dans *Xb* CS03 et *Xp* G6

L'introduction du gène *xaxAB* de *X. nematophila* dans *Xb* CS03 induit l'apparition d'une activité hémolytique totale sur boîte de gélose au sang (Tableau 3, Figure 18A et B et Article 3). En milieu liquide, *Xb* CS03/pBBR1-MCS2 ne présente pas d'activité hémolytique. L'ajout de l'insert *xaxAB* induit l'apparition d'une activité hémolytique sur les hématies de mouton (Tableau 5), mais pas sur les hématies de lapin. Ceci correspond à l'activité hémolytique « C1 » précédemment décrite (Brillard *et al.*, 2001) codée par le locus *xaxAB* (Vigneux *et al.*, 2007). Chez *Xp* G6, l'activité hémolytique sur boîte de la souche contenant *xaxAB* est partielle (hémolyse Farmer) et n'est pas systématiquement retrouvée (Tableau 4, Figure 18B et C). La souche *Xp* G6/pBBR1-MCS2 montre une forte activité hémolytique sur les deux types d'hématies (Tableau 5). Il nous est donc difficile de faire la part entre

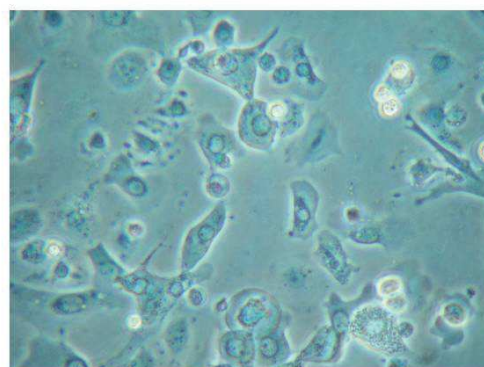
Tableau 5. Activité hémolytique des surnageants de culture des transconjugants pBBR1-MCS2 et pBB-*xax* de *Xb* CS03 et *Xp* G6. Les résultats sont exprimés en pourcentage de lyse des hématies, en considérant que le témoin positif donne 100% de lyse. Ces données sont issues du stage de master 2 de R. El Hajj (2011).

	Surnageants de culture des transconjugants <i>Xb</i> CS03				Surnageants de culture des transconjugants <i>Xp</i> G6				Témoin positif (PBS)	Témoin négatif (eau ultra-pure)
	<i>Xb</i> CS03/pBBR1-MCS2		<i>Xb</i> CS03/pBB- <i>xaxAB</i>		<i>Xp</i> G6/pBBR1-MCS2		<i>Xp</i> G6/pBB- <i>xaxAB</i>		0%	100 %
	Hématies de mouton	Hématies de lapin	Hématies de mouton	Hématies de lapin	Hématies de mouton	Hématies de lapin	Hématies de mouton	Hématies de lapin		
T=20h de culture	1%	1%	18%	2%	23%	75%	58%	42%		
T=30h de culture	0%	0%	53%	0,2%	40%	43%	52%	41%		
T=48h de culture	0%	2%	76%	8%	0%	5%	27%	16%		

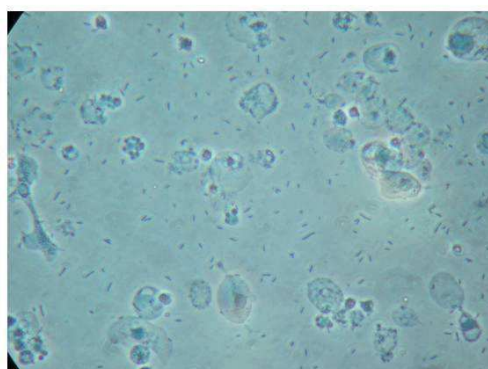
A

Souche	Taux de mortalité des hémocytes
Contrôle	73%
CS03 pBBR1-MCS2	74%
CS03 pBB- <i>xaxAB</i>	77%

B



C



D



Figure 19. Effet des transconjugants sur les hémocytes de *S. littoralis*. (A) Taux de mortalité des hémocytes de *S. littoralis* après 2h de contact avec les transconjugants *Xb* CS03/pBBR1-MCS2 et *Xb* CS03/pBB-*xaxAB*. Les hémocytes du contrôle ont été laissés en contact avec du TC-100 stérile. (B) Hémocytes n'ayant pas été en contact avec *Xb* ; (C) Hémocytes ayant été en contact avec *Xb* CS03/pBBR1-MCS2 ; (D) Hémocytes ayant été en contact avec *Xb* CS03/pBB-*xaxAB*.

cette activité hémolytique naturelle et celle induite par l'insert *xaxAB*. La fonction hémolytique est ainsi complétée par l'introduction de l'insert *xaxAB* chez la souche *Xb* CS03 et en partie chez la souche *Xp* G6.

3. Absence de complémentation de l'activité cytolytique par *xaxAB* dans *Xb* CS03

Le complexe *xaxAB* purifié induit l'apoptose et la nécrose des hémocytes (Vigneux *et al.*, 2007). Nous avons donc testé l'effet des bactéries *Xb* CS03/pBB-*xaxAB*, surexprimant le locus *xaxAB*, sur les hémocytes de *S. littoralis* (Figure 19). Nous n'avons pas observé de différence dans le taux de mortalité des hémocytes ayant été en contact avec *Xb* CS03/pBBR1-MCS2 ou *Xb* CS03/pBB-*xaxAB*. Cependant, ces hémocytes montraient une forte mortalité, même sans avoir été en contact avec les bactéries (Figure 19A). Les hémocytes ayant été en contact avec transconjugants avaient tendance à s'arrondir, ce qui indique une perte d'adhérence liée à un processus mis en place par *Xb* CS03. Cependant, nous n'avons observé aucune différence entre les transconjugants *Xb* CS03/pBBR1-MCS2 et *Xb*/CS03 pBB-*xaxAB* dans l'interaction avec les hémocytes (Figure 19C et D).

4. *Xb* CS03 pBB-*xaxAB* n'a pas d'effet sur la pathologie et la fitness de *S. weiseri*

Le locus *xaxAB* est exprimé tardivement dans l'insecte (Jubelin *et al.*, 2011) et potentiellement impliqué dans la dégradation du cadavre. Nous avons donc testé son effet sur le succès parasitaire et reproducteur du nématode, en injectant des bactéries *Xb* CS03 recombinantes dans une larve de *S. littoralis* préalablement infestée avec des *S. weiseri* aposymbiotiques. Nous n'avons cependant pu mettre en évidence aucune différence dans la mortalité (100% de mortalité 4 jours post-infestation, $p > 0,05$), le succès parasitaire (100% d'émergence 10 jours post-mortem dans les deux cas, $p > 0,05$) ou le succès reproducteur du nématode (succès reproducteur moyen : 28 000-31 000 IJ/insecte, $p > 0,05$) selon qu'on injecte *Xb* CS03 pBBR1-MCS2 ou *Xb* CS03 pBB-*xaxAB*.

D. Le gène XNC1_2096

1. Contexte génomique du gène XNC1_2096

Le gène XNC1_2096 de *X. nematophila* code une protéine hypothétique de 210 acides aminés. Son contexte génomique n'est pas conservé chez les autres souches de *Xenorhabdus* virulentes (Figure 20) : chez *X. nematophila*, XNC1_2096 appartient à un îlot génomique, et il est contenu dans un prophage chez *Xb* SS-2004. Chez *X. doucetiae*, l'homologue de XNC1_2096 se situe à proximité de *xaxAB*. Nous avons pu identifier des protéines homologues de XNC1_2096 chez d'autres genres de bactéries pathogènes. On en retrouve notamment deux copies chez l'espèce proche *Photorhabdus luminescens* ; il existe également chez une *E. coli* uropathogène (la souche IAI 39), chez le pathogène de plante *Erwinia*, et chez *Rahnella aquatilis*, une bactérie du sol pathogène opportuniste. Nous avons construit un arbre phylogénétique à partir des séquences de ces homologues (Figure 21). Les homologues de XNC1_2096 se répartissent en deux clusters.

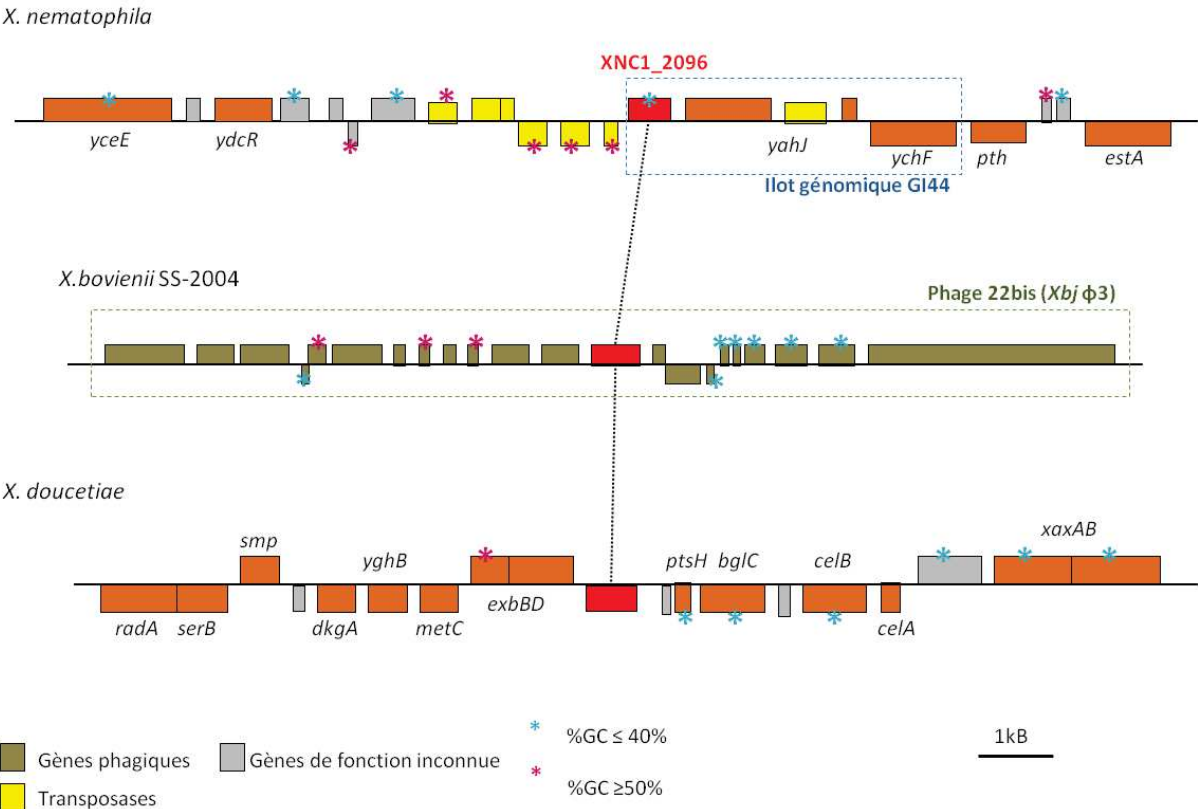


Figure 20. Contexte génomique du gène XNC1_2096 et de ses homologues chez *Xenorhabdus*.

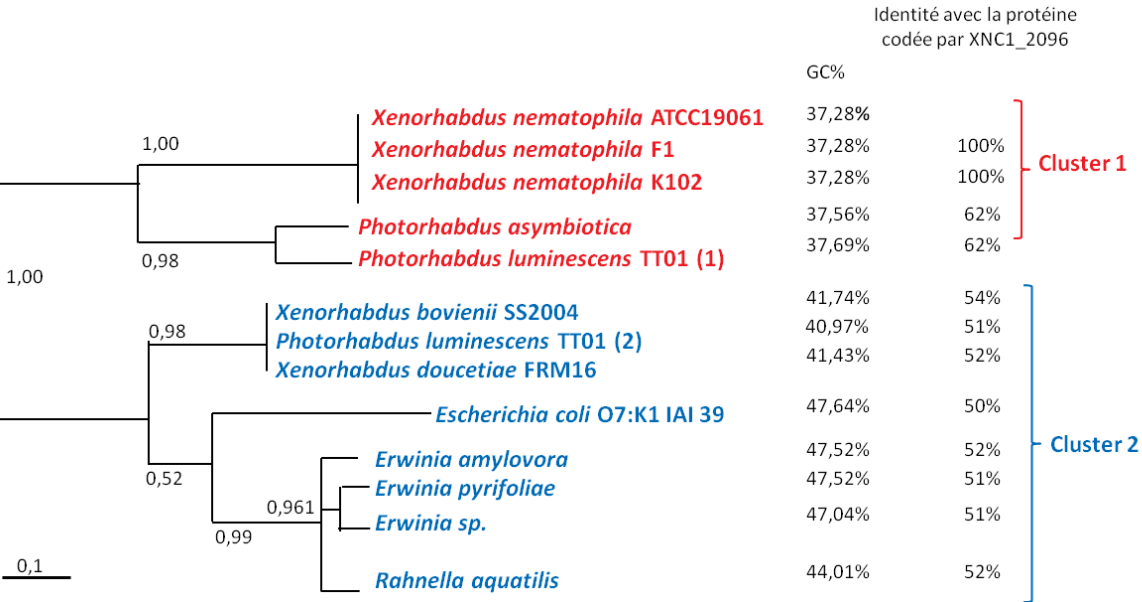


Figure 21. Arbre phylogénétique des homologues de XNC1_2096. Les séquences protéiques des homologues identifiés par Blast ont été alignées par l'algorithme Guidance (<http://guidance.tau.ac.il/index.html>, Penn et al., 2010). L'arbre a été construit grâce à l'algorithme PhyML (Guindon & Gascuel, 2003).

Le premier cluster comprend *X. nematophila* et deux espèces de *Photorhabdus*. Le deuxième cluster comprend des gènes plus éloignés de *X. bovienii*, *X. doucetiae*, *E. coli*, *Erwinia* et *Rahnella*. La présence d'homologues du gène XNC1_2096 dans les génomes de plusieurs espèces bactériennes pathogènes suggère un rôle potentiel dans la virulence.

2. Prédiction structurale de la protéine codée par XNC1_2096

Les analyses bioinformatiques de séquence et de structure (Blast, recherche de domaines conservés par HHpred et Psi-Blast, prédiction de structure par Tuto et Raptor, recherche de domaines transmembranaires) n'ont pas pu nous éclairer sur le rôle de la protéine codée par XNC1_2096, qui ne possède pas de domaine conservé. Il s'agirait cependant d'une protéine globulaire cytoplasmique, sans domaine transmembranaire (Gilles Labesse, communication personnelle après prédiction de structure par Jpred3 et @TOME2).

3. Absence d'activité protéasique directe

En galerie API, l'activité gélatinase de la souche *Xb* CS03 exprimant de façon constitutive XNC1_2096 est observable dès 72 heures alors qu'elle n'est observable qu'après 96 heures pour la souche CS03/pBBR1-MCS2 (Tableau 3 et Figure 22). Ce différentiel n'est pas visible pour *Xp* G6/pBB-XNC1_2096.

Nous avons donc tout d'abord recherché une activité protéasique des transconjugants. L'activité protéasique des surnageants de culture des transconjugants a été testée par suivi colorimétrique de la dégradation de l'azocaséine (recherche d'activité caséinolytique). Nous n'avons pas observé de différence dans l'activité protéolytique de cultures entières (surnageant de culture et cellules vivantes) de souches *Xb* CS03 contenant le pBBR1-MCS2 ou contenant l'insert XNC1_2096 (Figure 23). Nous avons également réalisé des zymogrammes afin de rechercher un différentiel d'activité protéolytique spécifique à la gélatine dans les surnageants et les extraits cellulaires des souches *Xb* CS03/pBBR1-MCS2 et *Xb* CS03/pBB-2096 (Figure 24). Nous avons retrouvé dans le surnageant deux bandes ayant une activité gélatinase (~100 kDa et ~40 kDa). La protéine correspondant à la bande de 40 kDa est particulièrement présente dans le surnageant de culture. Néanmoins, aucune différence d'activité gélatinase n'a pu être détectée entre les transconjugants.

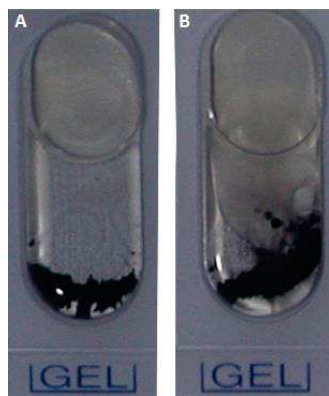


Figure 1. Activité gélatinase de *Xb* CS03 pBBR1-MCS2 (A) et *Xb* CS03 pBB-XNC1_2096 (B) après une incubation de 72h à 28°C en galerie API.

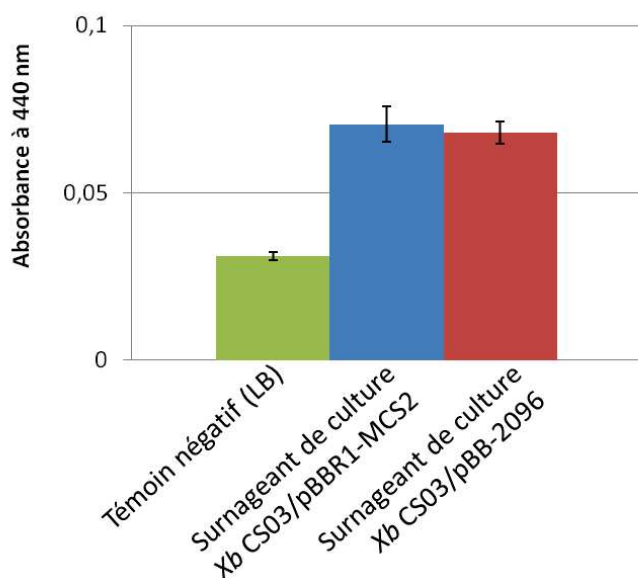


Figure 2. Activité caséinolytique de cultures entières (24h de croissance) des transconjugants *Xb* CS03/pBBR1-MCS2 et *Xb* CS03/pBB-2096. Les cultures entières des transconjugants ont été laissés en contact avec l'azocaséine sur la nuit (~16h). La dégradation de l'azocaséine libère un produit coloré dont l'absorbance à 440 nm peut être mesurée. Le témoin négatif a été réalisé en laissant en contact l'azocaséine avec du milieu LB.

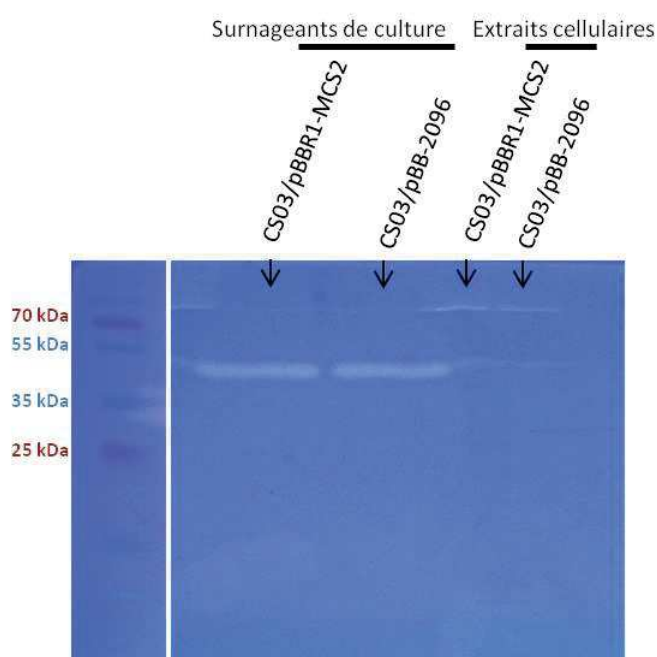


Figure 3. Activité gélatinasique des surnageants et des extraits cellulaires des transconjugants. Les bandes blanches correspondent à la dégradation de la gélatine par une protéase, et ne sont donc pas colorées par le bleu de Coomassie comme le reste du gel.

Enfin, la protéine codée par XNC1_2096 a été purifiée. Des tests préliminaires indiquent qu'elle ne possède pas d'activité hémolytique sur gélose au sang, protéolytique en galerie API ou sur zymogramme. Il semble donc que XNC1_2096 ne code pas directement une protéase, mais peut-être un régulateur de l'activité protéolytique.

IV- Conclusion

En comparant les génomes des souches virulentes et non-virulentes par injection, nous avons mis en évidence 59 gènes présents dans les trois souches virulentes (*Xb* SS-2004, *X. doucetiae* et *X. nematophila*) uniquement. Ces gènes sont isolés et se localisent à divers endroits du génome. Ainsi, chez *Xenorhabdus*, ces gènes ne sont pas regroupés en îlots génomiques. De plus, nous ne retrouvons qu'un petit nombre de gènes à la fois communs aux trois souches virulentes et absents des deux souches non-virulentes. Ceci suggère que, selon la souche de *Xenorhabdus* étudiée, les gènes du génome flexible, facteurs de virulence éventuels, sont très différents ; ainsi, les stratégies utilisées pour causer une pathologie chez l'insecte pourraient être très variables (voir Chapitre 1 et Chapitre 3).

A l'exception de *xaxAB* (Ribeiro *et al.*, 2003; Vigneux *et al.*, 2007), les gènes que nous avons identifiés durant cette comparaison génomique n'avaient jamais été décrits comme des facteurs de virulence de *X. nematophila*, ce qui montre l'importance de l'étude d'espèces différentes pour identifier les facteurs de virulence au sein du genre *Xenorhabdus*. Cependant, un rôle dans la virulence d'autres bactéries pathogènes avait été décrit pour PagC (Nishio *et al.*, 2005; Miller *et al.*, 1992) ou les systèmes toxine-antitoxine (Wang & Wood, 2011; Leung & Lévesque, 2012; Amitai *et al.*, 2004; Tashiro *et al.*, 2012). De plus, *xaxAB* et XNC1_2096 possèdent des homologues dans plusieurs bactéries pathogènes d'animaux ou de plantes. Ceci illustre la redondance des facteurs de virulence entre les différentes espèces bactériennes (voir Chapitre IV de l'introduction). Les protéines de fonction inconnue que nous avons identifiées pourraient donc être des facteurs de virulence de *Xenorhabdus*, mais également d'autres bactéries pathogènes.

Lors du criblage des gènes de virulence, seuls deux transconjugants montraient un phénotype nouveau et stable : les souches de *Xb* CS03 contenant les inserts *xaxAB* et XNC1_2096. Chez *Xp* G6, le phénotype était variable et l'activité hémolytique liée à l'insertion de *xaxAB* n'était pas toujours retrouvée ; nous n'avons pas pu mettre en évidence d'activité protéolytique chez la souche *Xp* G6 contenant l'insert XNC1_2096. Ainsi, la souche *Xb* CS03 semble être une meilleure candidate pour la complémentation de fonctions liées à la virulence, et certains des inserts que nous y avons introduits y étaient mieux exprimés. Chez *Xb* CS03, de nombreux facteurs de virulence potentiels sont pseudogénisés, ce qui a pu entraîner la non-virulence de la souche par injection (voir Chapitre 3). Ce

processus pourrait néanmoins avoir conservé les circuits régulant l'expression de ces anciens gènes de virulence, la réintroduction d'un facteur de virulence fonctionnel restaurant alors la fonction perdue. *Xp G6* ayant subi une forte réduction génomique (voir Chapitre 1), il est possible que tout le circuit menant à l'expression du facteur de virulence ait été perdu.

L'insertion dans les deux souches non-virulentes de *Xenorhabdus* des gènes candidats sélectionnés n'a pas entraîné d'augmentation de leur virulence. Ceci pourrait être dû au fait qu'un ensemble de gènes agissant en synergie est nécessaire pour entraîner la pathologie chez l'insecte ; ainsi, l'insertion de gènes isolés n'entraînerait pas de phénotypes visibles. Les souches non-virulentes pourraient également être trop fortement dépendantes du nématode associé pour que leur virulence par injection puisse être restaurée par l'introduction de nouveaux gènes.

Discussion et perspectives

Les couples *Steinernema-Xenorhabdus* sont expérimentalement dissociables. La virulence des partenaires individuels varie selon les associations : ainsi, au sein du couple *X. nematophila-S. carpocapsae*, les deux partenaires sont virulents indépendamment l'un de l'autre (Han & Ehlers, 2000; Sicard *et al.*, 2004a). Cette particularité en a fait le modèle historique pour l'étude du cycle némato-bactérien ainsi que dans la recherche des facteurs de virulence de *Xenorhabdus* (Herbert & Goodrich-Blair, 2007; Poinar, 1966; Poinar & Thomas, 1966). De nombreuses protéines permettant l'inhibition du système immunitaire de l'insecte ont notamment été identifiées chez *X. nematophila* (voir Chapitre de description du modèle et Nielsen-LeRoux *et al.*, 2012). Des protéases sécrétées par *S. carpocapsae* et inhibant le système immunitaire de l'insecte ont également été décrites récemment (Balasubramanian *et al.*, 2010; Toubarro *et al.*, 2013). Ainsi, les fonctions permettant la virulence sont redondantes entre la bactérie et le nématode au sein du couple *S. carpocapsae-X. nematophila*.

Durant ce travail de thèse, nous avons étudié deux couples némato-bactériens non dissociables : le couple *S. weiseri-Xb* CS03 et le couple *S. glaseri-Xp* G6. Les bactéries *Xb* CS03 et *Xp* G6 seule sont non-virulentes par injection dans l'insecte, et la reproduction des nématodes aposymbiotiques est altérée (Akhurst, 1986 et Chapitres 1 et 2). Dans le cas de ces couples némato-bactériens, il existe une complémentarité de fonction, entre les deux partenaires de la symbiose. Il devient alors important d'étudier le rôle de chacun des partenaires dans le processus d'infection de l'insecte. Par exemple, dans l'association *X. poinarii-S. glaseri*, le nématode protège la bactérie du système immunitaire de l'insecte grâce à ses protéines de cuticule externe (Wang & Gaugler, 1999; Liu *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2009). La co-injection de la bactérie avec ces protéines de cuticule ne restaure cependant qu'une virulence partielle (Liu *et al.*, 2012). *S. glaseri* semble donc assurer des fonctions de virulence supplémentaires au sein du couple némato-bactérien. Au cours de ce travail, nous avons montré que la bactérie *Xb* CS03 était sensible aux peptides antimicrobiens de l'insecte (Article 1) ; il serait donc intéressant d'étudier si le nématode associé, *S. weiseri*, assure cette fonction de la même façon que *S. glaseri*.

De plus, chez ces couples némato-bactériens fortement complémentaires, le déroulement de l'infestation de l'insecte pourrait différer de celui décrit chez *S. carpocapsae-X. nematophila*. En effet, *S. carpocapsae* se retrouve dans l'intestin de l'insecte 3 à 5 h post-infestation et libère *X. nematophila* dans l'hémolymphe à travers la paroi intestinale, provoquant la mort de la larve moins de 20h après l'infestation (Sicard *et al.*, 2004a). Cependant, si le nématode a pour rôle de protéger la bactérie du système immunitaire de l'insecte, il doit être présent dans l'hémolymphe en même temps que la bactérie. La libération de la bactérie pourrait être donc être plus tardive, ce qui pourrait entraîner la mortalité retardée des larves de *S. littoralis* que nous avons pu observer lors des

infestations avec le couple *S. weiseri*-*Xb* CS03 (Article 2). Le marquage des souches *Xp* G6 et *Xb* CS03 par un fluorochrome afin de suivre le processus d'infestation pourrait nous permettre de résoudre cette question.

Au cours de cette thèse, nous avons étudié les génomes de deux souches non-virulentes par injection: ceux de *Xb* CS03 et de *Xp* G6. A cette occasion, nous nous sommes rendus compte que les mécanismes ayant pu mener à la non-virulence sont différents chez ces deux souches :

Le génome de la souche *Xp* G6 est très réduit et plusieurs régions de plasticité génomique en sont absentes (voir Article 1). Des facteurs de virulence potentiels, ou connus pour leur implication dans la virulence de *X. nematophila*, comme les toxines Mcf et Tc, l'hémolysine XaxAB ou des systèmes de sécrétion de type V, sont absents chez *Xp* G6, ce qui pourrait expliquer la non-virulence de la souche par injection directe. La petite taille du génome, l'excision de larges régions génomiques ainsi que le petit nombre de pseudogènes laissent à penser que la souche *Xp* G6 est entrée dans un processus de rationalisation de son génome. Cependant, l'hypothèse d'une dérive génétique ne peut être exclue. En effet, dans les populations de *S. glaseri*, de nombreux nématodes sont aposymbiotiques (Akhurst 1986) : les populations de *Xp* G6 subissent donc des goulets d'étranglement évolutif à chaque cycle d'infestation des insectes et de réassociation avec le nématode. Au sein du génome de *Xp* G6, de nombreux loci toxine-antitoxine ont été perdus, soit au cours de l'excision des régions génomiques, soit suite à un relâchement de la pression de sélection qui s'exerçait sur eux. En effet, *Xp* G6 est fortement dépendante de son nématode associé, *S. glaseri*, pour la résistance au système immunitaire de l'insecte. Des loci toxine-antitoxine ayant un rôle connu dans la persistance, et pouvant être impliqués dans la résistance bactérienne au système immunitaire, ont donc pu être perdus suite à un transfert de cette compétence de la bactérie vers le nématode.

Le génome de la souche *Xb* CS03 est le plus grand génome de *Xenorhabdus* décrit à ce jour. Une comparaison génomique une souche appartenant à la même espèce, *Xb* SS-2004, nous a montré que la souche *Xb* CS03 contenait de nombreux pseudogènes, particulièrement de toxines, d'invasines et d'adhésines, et plusieurs loci permettant la synthèse de composés antimicrobiens spécifiques. *Xb* CS03 a ainsi une forte activité antimicrobienne contre plusieurs espèces bactériennes du sol ou associées à l'insecte. Il est probable que la souche *Xb* CS03 ait acquis plusieurs loci permettant la synthèse de composés antimicrobiens par transfert horizontal. Nous proposons que plusieurs gènes impliqués dans la virulence ont été pseudogénisés suite à cette acquisition : 1) soit ils ont subi une sélection purifiante, car les produits qu'ils codaient étaient trop coûteux métaboliquement, ou interféraient avec le mode de vie de la souche 2) soit car la pression de sélection exercée sur ces gènes a été relâchée suite au changement de mode de vie de la souche *Xb* CS03.

Ces deux souches ont ainsi subi des évolutions de génome complètement différentes, une réduction dans un cas et une expansion dans l'autre ; cependant, dans les deux cas, ces évolutions sont corrélées à une non-virulence par injection, ce qui suggère une forte complémentarité de fonction avec le nématode.

Xp G6 et *Xb* CS03 sont deux souches non-virulentes phylogénétiquement proches de souches virulentes. Ainsi, les souches de l'espèce *X. poinarii* sont non-virulentes par injection mais les autres espèces appartenant au clade C_{X-1} , dont *X. doucetiae*, sont virulentes (Figure 10). La souche *Xb* CS03 est quant à elle la seule souche non-virulente actuellement décrite au sein de l'espèce *X. bovienii*. Des données non publiées obtenues avec nos collègues de l'Université de l'Arizona (John G. Mc Mullen II et S. Patricia Stock) montrent cependant qu'elle n'est pas la seule. Ces différences de virulence entre des bactéries pourtant phylogénétiquement proches pourrait être dues au fait que leurs hôtes *Steinernema* sont différents. Il semble y avoir eu peu de coévolution entre *Steinernema* et *Xenorhabdus*, et les bactéries semblent avoir fréquemment changé d'hôte nématode (Lee & Stock, 2010b). Il est ainsi possible que les évolutions génomiques que nous avons pu mettre en évidence chez les deux souches non-virulentes soient dues à un changement de l'hôte nématode, entraînant une complémentation de fonction différente et faisant varier la pression de sélection exercée sur certains gènes, ou sur le génome entier. L'étude de la virulence ainsi que des génomes d'autres souches de *Xenorhabdus* dont la phylogénie suggère un changement d'hôte nous éclairerait sur leur effet sur *Xenorhabdus*. Ainsi, nous pourrions voir si un changement d'hôte entraîne toujours une perte de virulence bactérienne, une forte complémentarité avec le nématode et la pseudogénisation ou l'excision de facteurs de virulence, ou si l'évolution bactérienne suite à un changement d'hôte varie selon les associations *Xenorhabdus-Steinernema* formées.

Nous avons enfin comparé les génomes des souches virulentes et non-virulentes par injection afin d'identifier des facteurs de virulence communs à toutes les souches virulentes, qui constitueraient un *core-genome* de virulence. De façon surprenante, il n'existe que très peu de gènes homologues communs à toutes les souches de *Xenorhabdus* virulentes et absents des souches non-virulentes, et les gènes que nous avons identifiés étaient dispersés dans tout le génome. La virulence par injection chez *Xenorhabdus* n'est donc pas liée à l'acquisition d'un îlot de pathogénicité ou d'un plasmide de virulence. Il semble en revanche que les gènes permettant l'établissement de la pathologie chez un insecte varient en fonction des espèces de *Xenorhabdus*, et peut-être également en fonction du nématode associé ou d'une spécificité d'insecte. Le contenu du génome flexible, qui représente 40 à 50% des gènes présents dans une souche de *Xenorhabdus*, semble donc plus important dans l'établissement de la pathologie que le *core-genome* virulent que nous avons identifié. L'introduction

de nouveaux génomes, à la fois de souches virulentes et non-virulentes par injection, dans notre analyse de comparaison génomique nous permettrait de voir si les facteurs de virulence potentiels que nous avons identifiés sont réellement communs à toutes les souches virulentes, ou si la virulence chez l'insecte n'est qu'une question de génome flexible.

L'ensemble de ces travaux nous a permis de prendre la mesure de l'énorme variabilité des associations *Steinernema-Xenorhabdus*, de leur virulence envers les insectes et dans l'organisation et le contenu des génomes bactériens. L'étude de divers couples *Steinernema-Xenorhabdus* pourraient permettre à la fois de mettre en évidence de nouveaux mécanismes d'association symbiotique et de coévolution, d'étudier la virulence bactérienne ainsi que la complémentarité de fonctions entre deux partenaires d'une symbiose, et de mieux comprendre l'effet de l'association à un hôte sur les génomes bactériens.

Références bibliographiques

- Abby, S. & Daubin, V., 2007. Comparative genomics and the evolution of prokaryotes. *Trends in microbiology*, 15(3), p.135-141.
- Abby, S.S. *et al.*, 2012. Lateral gene transfer as a support for the tree of life. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(13), p.4962-4967.
- Achtman, M. & Wagner, M., 2008. Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. *Nature Reviews Microbiology*. Available at: http://apps.isiknowledge.com/full_record.do?product=UA&search_mode=Refine&qid=16&SID=Z24maGjONJfAI2j1fA&page=1&doc=6 [Consulté le mars 25, 2011].
- Akhurst, R.J., 1986. *Xenorhabdus nematophilus* subsp. *poinarii* - Its Interaction with Insect Pathogenic Nematodes. *Systematic and Applied Microbiology*, 8(1-2), p.142-147.
- Alm, R.A. *et al.*, 1999. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, 397(6715), p.176-180.
- Amitai, S., Yassin, Y. & Engelberg-Kulka, H., 2004. MazF-mediated cell death in *Escherichia coli*: a point of no return. *Journal of bacteriology*, 186(24), p.8295-8300.
- Andersson, J.O. & Andersson, S.G.E., 2001. Pseudogenes, Junk DNA, and the Dynamics of *Rickettsia* Genomes. *Molecular Biology and Evolution*, 18(5), p.829-839.
- Ansari, M., Tirry, L. & Moens, M., 2003. Entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria for the biological control of *Hoplia philanthus* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Biological Control*, 28(1), p.111-117.
- Arutyunov, D. & Frost, L.S., 2013. F conjugation: Back to the beginning. *Plasmid*, 70(1), p.18-32.
- Audoly, G. *et al.*, 2011. Effect of rickettsial toxin VapC on its eukaryotic host. *PloS one*, 6(10), p.e26528.
- Backert, S. & Meyer, T.F., 2006. Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology*, 9(2), p.207-217.
- Balasubramanian, N., Toubarro, D. & Simões, N., 2010. Biochemical study and in vitro insect immune suppression by a trypsin-like secreted protease from the nematode *Steinernema carpocapsae*. *Parasite Immunology*, 32(3), p.165-175.
- Barquist, L., Boinett, C.J. & Cain, A.K., 2013. Approaches to querying bacterial genomes with transposon-insertion sequencing. *RNA Biology*, 10(7), p.1161-1169.
- Bekal, S. *et al.*, 2003. Rapid identification of *Escherichia coli* pathotypes by virulence gene detection with DNA microarrays. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(5), p.2113-2125.
- Bellanger, X. *et al.*, 2014. Conjugative and mobilizable genomic islands in bacteria: evolution and diversity. *FEMS microbiology reviews*, 38(4), p.720-760.
- Bentley, S.D. *et al.*, 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces*

coelicolor A3(2). *Nature*, 417(6885), p.141-147.

Berleman, J. & Auer, M., 2013. The role of bacterial outer membrane vesicles for intra- and interspecies delivery. *Environmental Microbiology*, 15(2), p.347-354.

Binnewies, T.T. *et al.*, 2006. Ten years of bacterial genome sequencing: comparative-genomics-based discoveries. *Functional & integrative genomics*, 6(3), p.165-185.

Bisch, G. *et al.*, 2014. *Xenorhabdus bovienii* CS03, the bacterial symbiont of the entomopathogenic nematode *Steinernema weiseri*, is a non-virulent strain against lepidopteran insects. *Journal of Invertebrate Pathology*.

Boch, J. *et al.*, 2002. Identification of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* genes induced during infection of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Microbiology*, 44(1), p.73-88.

Boemare, N., 2002. Biology, Taxonomy, and Systematics of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. In R. Gaugler, éd. *Entomopathogenic Nematology*. Wallingford: CABI Publishing.

Boemare, N., Thaler, J.O. & Lanois, A., 1997. Simple bacteriological tests for phenotypic characterization of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* phase variants. *Symbiosis*, 22(1-2), p.167-175.

Bolotin, A. *et al.*, 2004. Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Nature Biotechnology*, 22(12), p.1554-1558.

Bonnington, K.E. & Kuehn, M.J., 2014. Protein selection and export via outer membrane vesicles. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1843(8), p.1612-1619.

Boucher, Y., Nesbø, C.L. & Doolittle, W.F., 2001. Microbial genomes: dealing with diversity. *Current opinion in microbiology*, 4(3), p.285-289.

Bourhy, P. *et al.*, 2005. Random insertional mutagenesis of *Leptospira interrogans*, the agent of leptospirosis, using a mariner transposon. *Journal of Bacteriology*, 187(9), p.3255-3258.

Bratlie, M.S. *et al.*, 2010. Gene duplications in prokaryotes can be associated with environmental adaptation. *BMC Genomics*, 11, p.588.

Brillard, J. *et al.*, 2002. The PhIA hemolysin from the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens* belongs to the two-partner secretion family of hemolysins. *Journal of Bacteriology*, 184(14), p.3871-3878.

Brillard, J. *et al.*, 2001. Two distinct hemolytic activities in *Xenorhabdus nematophila* are active against immunocompetent insect cells. *Applied and environmental microbiology*, 67(6), p.2515-2525.

Bron, P.A. *et al.*, 2004. Identification of *Lactobacillus plantarum* genes that are induced in the gastrointestinal tract of mice. *Journal of Bacteriology*, 186(17), p.5721-5729.

Brussow, H., Canchaya, C. & Hardt, W.-D., 2004. Phages and the Evolution of Bacterial Pathogens: from Genomic Rearrangements to Lysogenic Conversion. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(3), p.560-602.

- Brzuszkiewicz, E. *et al.*, 2006. How to become a uropathogen: comparative genomic analysis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(34), p.12879-12884.
- Cabral, C.M. *et al.*, 2004. Purification and Characterization of Two Distinct Metalloproteases Secreted by the Entomopathogenic Bacterium *Photorhabdus* sp. Strain Az29. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(7), p.3831-3838.
- Cairns, J., 1963. The bacterial chromosome and its manner of replication as seen by autoradiography. *Journal of molecular biology*, 6, p.208-213.
- Caldas, C. *et al.*, 2002. Purification and Characterization of an Extracellular Protease from *Xenorhabdus nematophila* Involved in Insect Immunosuppression. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(3), p.1297-1304.
- Carattoli, A., 2013. Plasmids and the spread of resistance. *International journal of medical microbiology: IJMM*, 303(6-7), p.298-304.
- Caro-Quintero, A. & Konstantinidis, K.T., 2012. Bacterial species may exist, metagenomics reveal: Bacterial species may exist. *Environmental Microbiology*, 14(2), p.347-355.
- Casjens, S. *et al.*, 2000. A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Molecular Microbiology*, 35(3), p.490-516.
- Cerenius, L. & Söderhäll, K., 2004. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological reviews*, 198, p.116-126.
- Chandra, H. *et al.*, 2008. Type 1 fimbriae of insecticidal bacterium *Xenorhabdus nematophila* is necessary for growth and colonization of its symbiotic host nematode *Steinernema carpocapsae*. *Environmental Microbiology*, 10(5), p.1285-1295.
- Chapuis, é. *et al.*, 2009. Manifold aspects of specificity in a nematode-bacterium mutualism. *Journal of Evolutionary Biology*, 22(10), p.2104-2117.
- Chaston, J.M. *et al.*, 2011. The Entomopathogenic Bacterial Endosymbionts *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: Convergent Lifestyles from Divergent Genomes. *PLoS ONE*, 6(11), p.e27909.
- Chen, G. *et al.*, 1996. Chitinase activity of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* species, bacterial associates of entomopathogenic nematodes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 68(2), p.101-108.
- Cheng, C. *et al.*, 2013. Targeted and random mutagenesis of *Ehrlichia chaffeensis* for the identification of genes required for in vivo infection. *PLoS pathogens*, 9(2), p.e1003171.
- Christensen-Dalsgaard, M. & Gerdes, K., 2006. Two *higBA* loci in the *Vibrio cholerae* superintegron encode mRNA cleaving enzymes and can stabilize plasmids. *Molecular Microbiology*, 62(2), p.397-411.

- Claes, M.F. & Dunlap, P.V., 2000. Aposymbiotic culture of the sepiolid squid *Euprymna scolopes*: role of the symbiotic bacterium *Vibrio fischeri* in host animal growth, development, and light organ morphogenesis. *The Journal of Experimental Zoology*, 286(3), pp.280–296.
- Claverys, J.-P. & Martin, B., 2003. Bacterial ‘competence’ genes: signatures of active transformation, or only remnants? *Trends in Microbiology*, 11(4), p.161–165.
- Cohan, F.M., 2002. What are bacterial species? *Annual Review of Microbiology*, 56, p.457–487.
- Cohan, F.M. & Koeppel, A.F., 2008. The Origins of Ecological Diversity in Prokaryotes. *Current Biology*, 18(21), p.R1024–R1034.
- Coleman, D. *et al.*, 1991. Insertional inactivation of the *Staphylococcus aureus* β -toxin by bacteriophage ϕ 13 occurs by site-and orientation-specific integration of the ϕ 13 genome. *Molecular Microbiology*, 5(4), p.933–939.
- Cole, S.T. *et al.*, 2001. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature*, 409(6823), p.1007–1011.
- Cosentino, S. *et al.*, 2013. PathogenFinder--distinguishing friend from foe using bacterial whole genome sequence data. *PLoS One*, 8(10), p.e77302.
- Couturier, E. & Rocha, E.P.C., 2006. Replication-associated gene dosage effects shape the genomes of fast-growing bacteria but only for transcription and translation genes. *Molecular Microbiology*, 59(5), p.1506–1518.
- Cowles, C.E. & Goodrich-Blair, H., 2008. The *Xenorhabdus nematophila* *niABC* Genes Confer the Ability of *Xenorhabdus* spp. To Colonize *Steinernema carpocapsae* Nematodes. *Journal of Bacteriology*, 190(12), p.4121–4128.
- Cowles, K.N. & Goodrich-Blair, H., 2005. Expression and activity of a *Xenorhabdus nematophila* haemolysin required for full virulence towards *Manduca sexta* insects. *Cellular microbiology*, 7(2), p.209–219.
- Crawford, J.M. *et al.*, 2012. Small molecule perimeter defense in entomopathogenic bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22711807> [Consulté le juin 25, 2012].
- De la Cruz, M.A. *et al.*, 2013. A Toxin-Antitoxin Module of *Salmonella* Promotes Virulence in Mice. *PLoS Pathogens*, 9(12). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3868539/> [Consulté le octobre 18, 2014].
- Daborn, P.J. *et al.*, 2002. A single *Photorhabdus* gene, *makes caterpillars floppy (mcf)*, allows *Escherichia coli* to persist within and kill insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(16), p.10742–10747.
- Dagan, T., 2011. Phylogenomic networks. *Trends in Microbiology*, 19(10), p.483–491.
- Dagan, T. & Martin, W., 2006. The tree of one percent. *Genome Biology*, 7(10), p.118.

- Darling, A.E., Miklos, I. & Ragan, M.A., 2008. Dynamics of Genome Rearrangement in Bacterial Populations. *PLoS Genetics*, 4(7). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2483231/> [Consulté le juillet 19, 2014].
- Darwin, C., 1859. *On the Origin of Species by Means of Natural Selection or the Preservation of Favored Races in the Struggle for Life.*, London: John Murray.
- Daubin, V., Moran, N.A. & Ochman, H., 2003. Phylogenetics and the Cohesion of Bacterial Genomes. *Science*, 301(5634), p.829-832.
- Daubin, V. & Perrière, G., 2003. G+C3 structuring along the genome: a common feature in prokaryotes. *Molecular Biology and Evolution*, 20(4), p.471-483.
- Dawkins, R., 1976. *The selfish gene*, New York: Oxford University Press.
- Degnan, P.H. *et al.*, 2010. Dynamics of genome evolution in facultative symbionts of aphids. *Environmental Microbiology*, 12(8), p.2060-2069.
- Dhakal, B.K. & Mulvey, M.A., 2012. The UPEC pore-forming toxin α -hemolysin triggers proteolysis of host proteins to disrupt cell adhesion, inflammatory, and survival pathways. *Cell Host & Microbe*, 11(1), p.58-69.
- Dobrindt, U. *et al.*, 2004. Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nature reviews. Microbiology*, 2(5), p.414-424.
- Doolittle, W.F. & Papke, R.T., 2006. Genomics and the bacterial species problem. *Genome Biology*, 7(9), p.116.
- Doolittle, W.F. & Zhaxybayeva, O., 2009. On the origin of prokaryotic species. *Genome Research*, 19(5), p.744-756.
- Dorrell, N., Hinchliffe, S.J. & Wren, B.W., 2005. Comparative phylogenomics of pathogenic bacteria by microarray analysis. *Current Opinion in Microbiology*, 8(5), p.620-626.
- Dubey, G.P. & Ben-Yehuda, S., 2011. Intercellular Nanotubes Mediate Bacterial Communication. *Cell*, 144(4), p.590-600.
- Dufresne, A., Garczarek, L. & Partensky, F., 2005. Accelerated evolution associated with genome reduction in a free-living prokaryote. *Genome Biology*, 6(2), p.R14.
- Dunning Hotopp, J.C. *et al.*, 2007. Widespread lateral gene transfer from intracellular bacteria to multicellular eukaryotes. *Science*, 317(5845), p.1753-1756.
- Dunphy, G.B. & Webster, J.M., 1984. Interaction of *Xenorhabdus nematophilus* subsp. *nematophilus* with the haemolymph of *Galleria mellonella*. *Journal of Insect Physiology*, 30(11), p.883-889.
- Duvic, B. *et al.*, 2012. Cecropins as a marker of *Spodoptera frugiperda* immunosuppression during entomopathogenic bacterial challenge. *Journal of insect physiology*, 58(6), p.881-888.

- Earl, A.M., Losick, R. & Kolter, R., 2007. *Bacillus subtilis* Genome Diversity. *J. Bacteriol.*, 189(3), p.1163-1170.
- Ehlers, R.U., Wulff, A. & Peters, A., 1997. Pathogenicity of axenic *Steinernema feltiae*, *Xenorhabdus bovienii*, and the bacto-helminthic complex to larvae of *Tipula oleracea* (Diptera) and *Galleria mellonella* (Lepidoptera). *Journal of invertebrate pathology*, 69(3), p.212-217.
- El Hajj, R., 2011. *Identification de nouveaux facteurs de virulence chez la bactérie pathogène d'insecte Xenorhabdus par génomique comparative et fonctionnelle*. Master 2. Université de Montpellier 2.
- Ellison, D.W. *et al.*, 2008. Genomic Comparison of Virulent *Rickettsia rickettsii* Sheila Smith and Avirulent *Rickettsia rickettsii* Iowa. *Infection and Immunity*, 76(2), p.542-550.
- Ellis, T.C. *et al.*, 2013. In vivo expression technology identifies a novel virulence factor critical for *Borrelia burgdorferi* persistence in mice. *PLoS pathogens*, 9(8), p.e1003567.
- Emelianoff, V. *et al.*, 2008. Isolation and identification of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria from Hérault and Gard (Southern France). *Journal of Invertebrate Pathology*, 98(2), p.211-217.
- Engel, P., Stepanauskas, R. & Moran, N.A., 2014. Hidden Diversity in Honey Bee Gut Symbionts Detected by Single-Cell Genomics. *PLoS Genet*, 10(9), p.e1004596.
- Esnault, E. *et al.*, 2007. Chromosome structuring limits genome plasticity in *Escherichia coli*. *PLoS genetics*, 3(12), p.e226.
- Falkow, S., 1988. Molecular Koch's postulates applied to microbial pathogenicity. *Reviews of Infectious Diseases*, 10 Suppl 2, p.S274-276.
- Falkow, S., Isberg, R.R. & Portnoy, D.A., 1992. The Interaction of Bacteria with Mammalian Cells. *Annual Review of Cell Biology*, 8(1), p.333-363.
- Farmer, J.J. *et al.*, 1989. *Xenorhabdus luminescens* (DNA hybridization group 5) from human clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 27(7), p.1594-1600.
- Fedhila, S. *et al.*, 2006. Identification of *Bacillus cereus* internalin and other candidate virulence genes specifically induced during oral infection in insects. *Molecular Microbiology*, 62(2), p.339-355.
- Felsheim, R.F., Kurtti, T.J. & Munderloh, U.G., 2009. Genome sequence of the endosymbiont *Rickettsia peacockii* and comparison with virulent *Rickettsia rickettsii*: identification of virulence factors. *PloS one*, 4(12), p.e8361.
- Feng, Y. *et al.*, 2012. Pseudogene recoding revealed from proteomic analysis of *Salmonella* serovars. *Journal of proteome research*, 11(3), p.1715-1719.
- Filloux, A., 2013. The rise of the Type VI secretion system. *F1000prime reports*, 5, p.52.
- Finlay, B.B. & Falkow, S., 1997. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 61(2), p.136-169.

- Fleischmann, R.D. *et al.*, 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*, 269(5223), p.496-512.
- Focht, D.D. & Lockhart, W.R., 1965. Numerical survey of some bacterial taxa. *Journal of Bacteriology*, 90(5), p.1314-1319.
- Forst, S.A. & Roberts, D.L., 1994. Signal transduction by the EnvZ-OmpR phosphotransfer system in bacteria. *Research in microbiology*, 145(5-6), p.363-373.
- Fortier, L.-C. & Sekulovic, O., 2013. Importance of prophages to evolution and virulence of bacterial pathogens. *Virulence*, 4(5), p.354-365.
- Foster, J.S. & McFall-Ngai, M.J., 1998. Induction of apoptosis by cooperative bacteria in the morphogenesis of host epithelial tissues. *Development Genes and Evolution*, 208(6), p.295-303.
- Fox, G.E., Pechman, K.R. & Woese, C.R., 1977. Comparative Cataloging of 16S Ribosomal Ribonucleic Acid: Molecular Approach to Procaryotic Systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 27(1), p.44-57.
- Fox, G.E., Wisotzkey, J.D. & Jurtshuk, P., 1992. How Close Is Close: 16S rRNA Sequence Identity May Not Be Sufficient To Guarantee Species Identity. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42(1), p.166-170.
- Francis, M.S. *et al.*, 1993. Bacteriophage Lambda as a Delivery Vector for Tn10-Derived Transposons in *Xenorhabdus bovienii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(9), p.3050-3055.
- Fraser, C. *et al.*, 2009. The bacterial species challenge: making sense of genetic and ecological diversity. *Science*, 323(5915), p.741-746.
- Fraser, C.M. *et al.*, 1997. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature*, 390(6660), p.580-586.
- Fraser, C.M. *et al.*, 1995. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science*, 270(5235), p.397-403.
- Fraser-Liggett, C.M., 2005. Insights on biology and evolution from microbial genome sequencing. *Genome Research*, 15(12), p.1603-1610.
- Freiberg, C. *et al.*, 1997. Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature*, 387(6631), p.394-401.
- Galán, J.E. & Collmer, A., 1999. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science*, 284(5418), p.1322-1328.
- Gal-Mor, O. & Finlay, B.B., 2006. Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence. *Cellular Microbiology*, 8(11), p.1707-1719.
- Galtier, N. & Daubin, V., 2008. Dealing with incongruence in phylogenomic analyses. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 363(1512), p.4023-4029.

- Garaizar, J., Rementeria, A. & Porwollik, S., 2006. DNA microarray technology: a new tool for the epidemiological typing of bacterial pathogens ? *FEMS immunology and medical microbiology*, 47(2), p.178-189.
- Garcia Vescovi, E., Soncini, F.C. & Groisman, E.A., 1994. The role of the PhoP/PhoQ regulon in *Salmonella* virulence. *Research in microbiology*, 145(5-6), p.473-480.
- Garcillán-Barcia, M.P., Alvarado, A. & de la Cruz, F., 2011. Identification of bacterial plasmids based on mobility and plasmid population biology. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(5), p.936-956.
- Gaudriault, S. *et al.*, 2008. Plastic architecture of bacterial genome revealed by comparative genomics of *Photorhabdus* variants. *Genome biology*, 9(7), p.R117.
- Gaugler, R., 2002. *Entomopathogenic Nematology*, Wallingford: CABI Publishing.
- Gerdes, K. & Maisonneuve, E., 2012. Bacterial persistence and toxin-antitoxin loci. *Annual Review of Microbiology*, 66, p.103-123.
- Gevers, D. *et al.*, 2004. Gene duplication and biased functional retention of paralogs in bacterial genomes. *Trends in microbiology*, 12(4), p.148-154.
- Gevers, D. *et al.*, 2005. Re-evaluating prokaryotic species. *Nature Reviews Microbiology*, 3(9), p.733-739.
- Gevers, D. *et al.*, 2006. Stepping stones towards a new prokaryotic taxonomy. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 361(1475), p.1911-1916.
- Gillespie, J.P., Kanost, M.R. & Trenczek, T., 1997. Biological mediators of insect immunity. *Annual review of entomology*, 42, p.611-643.
- Gill, S.R. *et al.*, 2005. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. *Journal of Bacteriology*, 187(7), p.2426-2438.
- Gil, R. & Latorre, A., 2012. Factors Behind Junk DNA in Bacteria. *Genes*, 3(4), p.634-650.
- Giovannoni, S.J. *et al.*, 2005. Genome streamlining in a cosmopolitan oceanic bacterium. *Science*, 309(5738), p.1242-1245.
- Giovannoni, S.J., Cameron Thrash, J. & Temperton, B., 2014. Implications of streamlining theory for microbial ecology. *The ISME Journal*, 8(8), p.1553-1565.
- Givaudan, A. & Lanois, A., 2000. *flhDC*, the Flagellar Master Operon of *Xenorhabdus nematophilus*: Requirement for Motility, Lipolysis, Extracellular Hemolysis, and Full Virulence in Insects. *Journal of Bacteriology*, 182(1), p.107-115.
- Glöckner, F.O. *et al.*, 2003. Complete genome sequence of the marine planctomycete *Pirellula* sp. strain 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(14), p.8298-8303.

- Gogarten, J.P., Doolittle, W.F. & Lawrence, J.G., 2002. Prokaryotic evolution in light of gene transfer. *Molecular Biology and Evolution*, 19(12), p.2226-2238.
- González, A. *et al.*, 2011. Detection and functional characterization of a large genomic deletion resulting in decreased pathogenicity in *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 strains. *Environmental Microbiology*, 13(12), p.3172-3185.
- Goodrich-Blair, H. & Clarke, D.J., 2007. Mutualism and pathogenesis in *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: two roads to the same destination. *Molecular microbiology*, 64(2), p.260-268.
- Gotfredsen, M. & Gerdes, K., 1998. The *Escherichia coli* *relBE* genes belong to a new toxin-antitoxin gene family. *Molecular Microbiology*, 29(4), p.1065-1076.
- Goudenège, D. *et al.*, 2013. Comparative genomics of pathogenic lineages of *Vibrio nigripulchritudo* identifies virulence-associated traits. *The ISME journal*, 7(10), p.1985-1996.
- Gouge, D.H. & Snyder, J.L., 2006. Temporal association of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) and bacteria. *Journal of invertebrate pathology*, 91(3), p.147-157.
- Groisman, E.A. & Ochman, H., 1996. Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps. *Cell*, 87(5), p.791-794.
- Grumann, D., Nübel, U. & Bröker, B.M., 2014. *Staphylococcus aureus* toxins – Their functions and genetics. *Infection, Genetics and Evolution*, 21, p.583-592.
- Guérout, A.-M. *et al.*, 2013. Characterization of the *phd-doc* and *ccd* toxin-antitoxin cassettes from *Vibrio* superintegrons. *Journal of bacteriology*.
- Guglielmini, J. *et al.*, 2011. The Repertoire of ICE in Prokaryotes Underscores the Unity, Diversity, and Ubiquity of Conjugation. *PLoS Genet*, 7(8), p.e1002222.
- Guglielmini, J., Cruz, F. de la & Rocha, E.P.C., 2013. Evolution of Conjugation and Type IV Secretion Systems. *Molecular Biology and Evolution*, 30(2), p.315-331.
- Guindon, S. & Gascuel, O., 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic biology*, 52(5), p.696-704.
- Guo, X. *et al.*, 2003. Natural genomic design in *Sinorhizobium meliloti*: novel genomic architectures. *Genome Research*, 13(8), p.1810-1817.
- Hacker, J. *et al.*, 1997. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Molecular microbiology*, 23(6), p.1089-1097.
- Hacker, J. *et al.*, 2004. Pathogenomics of mobile genetic elements of toxigenic bacteria. *International journal of medical microbiology: IJMM*, 293(7-8), p.453-461.
- Hacker, J. & Carniel, E., 2001. Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. A Darwinian view of the evolution of microbes. *EMBO reports*, 2(5), p.376-381.

- Hanage, W.P., Fraser, C. & Spratt, B.G., 2005. Fuzzy species among recombinogenic bacteria. *BMC biology*, 3, p.6.
- Hanage, W.P., Fraser, C. & Spratt, B.G., 2006. Sequences, sequence clusters and bacterial species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 361(1475), p.1917-1927.
- Han, R. & Ehlers, R.-U., 2000. Pathogenicity, Development, and Reproduction of *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae* under Axenic in Vivo Conditions. *Journal of Invertebrate Pathology*, 75(1), p.55-58.
- Hao, Y.-J. *et al.*, 2010. Transcripts analysis of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* induced in vitro with insect haemolymph. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 169(2), p.79-86.
- Harth, E. *et al.*, 2007. Intragenomic heterogeneity and intergenomic recombination among *Vibrio parahaemolyticus* 16S rRNA genes. *Microbiology (Reading, England)*, 153(Pt 8), p.2640-2647.
- Hayes, C.S., Aoki, S.K. & Low, D.A., 2010. Bacterial Contact-Dependent Delivery Systems. *Annual Review of Genetics*, 44(1), p.71-90.
- Hazan, R. *et al.*, 2001. Postsegregational killing mediated by the P1 phage « addiction module » phd-doc requires the *Escherichia coli* programmed cell death system *mazEF*. *Journal of bacteriology*, 183(6), p.2046-2050.
- Helgason, E. *et al.*, 2000. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*—One Species on the Basis of Genetic Evidence. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(6), p.2627-2630.
- Helm, R.A. *et al.*, 2003. Genomic rearrangements at *rrn* operons in *Salmonella*. *Genetics*, 165(3), p.951-959.
- Hendrickson, H. & Lawrence, J.G., 2007. Mutational bias suggests that replication termination occurs near the *dif* site, not at Ter sites. *Molecular Microbiology*, 64(1), p.42-56.
- Heng, H.H.Q., 2009. The genome-centric concept: resynthesis of evolutionary theory. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 31(5), p.512-525.
- Hentschel, U., Steinert, M. & Hacker, J., 2000. Common molecular mechanisms of symbiosis and pathogenesis. *Trends in microbiology*, 8(5), p.226-231.
- Herbert, E.E. & Goodrich-Blair, H., 2007. Friend and foe: the two faces of *Xenorhabdus nematophila*. *Nature reviews. Microbiology*, 5(8), p.634-646.
- Hershberg, R., Tang, H. & Petrov, D.A., 2007. Reduced selection leads to accelerated gene loss in *Shigella*. *Genome Biology*, 8(8), p.R164.
- He, S.Y., Nomura, K. & Whittam, T.S., 2004. Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1694(1-3), p.181-206.

- Hooper, S.D. & Berg, O.G., 2003. On the nature of gene innovation: duplication patterns in microbial genomes. *Molecular Biology and Evolution*, 20(6), p.945-954.
- Ho Sui, S.J. *et al.*, 2009. The Association of Virulence Factors with Genomic Islands. *PLoS ONE*, 4(12). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2779486/> [Consulté le mai 25, 2013].
- Hughes, D., 2000. Evaluating genome dynamics: the constraints on rearrangements within bacterial genomes. *Genome Biology*, 1(6), p.reviews0006.1-reviews0006.8.
- Isberg, R.R., Voorhis, D.L. & Falkow, S., 1987. Identification of invasins: a protein that allows enteric bacteria to penetrate cultured mammalian cells. *Cell*, 50(5), p.769-778.
- Israel, D.A. *et al.*, 2001. *Helicobacter pylori* genetic diversity within the gastric niche of a single human host. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(25), p.14625-14630.
- Jalan, N. *et al.*, 2013. Comparative genomic and transcriptome analyses of pathotypes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* provide insights into mechanisms of bacterial virulence and host range. *BMC genomics*, 14, p.551.
- Ji, D. & Kim, Y., 2004. An entomopathogenic bacterium, *Xenorhabdus nematophila*, inhibits the expression of an antibacterial peptide, cecropin, of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *Journal of insect physiology*, 50(6), p.489-496.
- Jing, Y. *et al.*, 2010. Cloning, characterisation and heterologous expression of an astacin metalloprotease, Sc-AST, from the entomoparasitic nematode *Steinernema carpocapsae*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 174(2), p.101-108.
- Jin, Q. *et al.*, 2002. Genome sequence of *Shigella flexneri* 2a: insights into pathogenicity through comparison with genomes of *Escherichia coli* K12 and O157. *Nucleic acids research*, 30(20), p.4432-4441.
- Johannessen, M., Sollid, J.E. & Hanssen, A.-M., 2012. Host- and microbe determinants that may influence the success of *Staphylococcus aureus* colonization. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2, p.56.
- Johnson, T.J. *et al.*, 2013. Comparative genome analysis of an avirulent and two virulent strains of avian *Pasteurella multocida* reveals candidate genes involved in fitness and pathogenicity. *BMC microbiology*, 13(1), p.106.
- Johnston, C. *et al.*, 2014. Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control. *Nature Reviews. Microbiology*, 12(3), p.181-196.
- Jubelin, G. *et al.*, 2013. FlhZ is a global regulatory protein affecting the expression of flagellar and virulence genes in individual *Xenorhabdus nematophila* bacterial cells. *PLoS genetics*, 9(10), p.e1003915.

- Jubelin, G. *et al.*, 2011. Studies of the dynamic expression of the *Xenorhabdus* FliAZ regulon reveal atypical iron-dependent regulation of the flagellin and haemolysin genes during insect infection. *Environmental Microbiology*, 13(5), p.1271-1284.
- Kalman, S. *et al.*, 1999. Comparative genomes of *Chlamydia pneumoniae* and *C. trachomatis*. *Nature Genetics*, 21(4), p.385-389.
- Kambara, K. *et al.*, 2009. *Rhizobia* utilize pathogen-like effector proteins during symbiosis. *Molecular Microbiology*, 71(1), p.92-106.
- Karamichali, I. *et al.*, 2014. Frequent gene fissions associated with human pathogenic bacteria. *Genomics*, 103(1), p.65-75.
- Kashtan, N. *et al.*, 2014. Single-Cell Genomics Reveals Hundreds of Coexisting Subpopulations in Wild *Prochlorococcus*. *Science*, 344(6182), p.416-420.
- Katayama, Y. *et al.*, 2013. Beta-Hemolysin Promotes Skin Colonization by *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology*, 195(6), p.1194-1203.
- Kaya, H.K. & Gaugler, R., 1993. Entomopathogenic Nematodes. *Annual Review of Entomology*, 38(1), p.181-206.
- Kelley, J.L. *et al.*, 2014. Compact genome of the Antarctic midge is likely an adaptation to an extreme environment. *Nature Communications*, 5, p.4611.
- Khandelwal, P. *et al.*, 2004. Insecticidal pilin subunit from the insect pathogen *Xenorhabdus nematophila*. *Journal of bacteriology*, 186(19), p.6465-6476.
- Kimbrel, J.A. *et al.*, 2011. RNA-Seq for Plant Pathogenic Bacteria. *Genes*, 2(4), p.689-705.
- Kim, S.K., Flores-Lara, Y. & Patricia Stock, S., 2012. Morphology and ultrastructure of the bacterial receptacle in *Steinernema* nematodes (Nematoda: Steinernematidae). *Journal of invertebrate pathology*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22564260>.
- Kitagawa, R. *et al.*, 2010. Biogenesis of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* membrane vesicles provoked by induction of PagC. *Journal of bacteriology*, 192(21), p.5645-5656.
- Kitahara, K. & Miyazaki, K., 2013. Revisiting bacterial phylogeny: Natural and experimental evidence for horizontal gene transfer of 16S rRNA. *Mobile Genetic Elements*, 3(1), p.e24210.
- Klemm, P. & Schembri, M.A., 2000. Bacterial adhesins: function and structure. *International journal of medical microbiology: IJMM*, 290(1), p.27-35.
- Klenk, H.-P. & Göker, M., 2010. En route to a genome-based classification of Archaea and Bacteria? *Systematic and Applied Microbiology*, 33(4), p.175-182.
- Kline, K.A. *et al.*, 2009. Bacterial adhesins in host-microbe interactions. *Cell host & microbe*, 5(6), p.580-592.

- Kobayashi, I., 2001. Behavior of restriction–modification systems as selfish mobile elements and their impact on genome evolution. *Nucleic Acids Research*, 29(18), p.3742–3756.
- Koga, R. *et al.*, 2013. Evolutionary replacement of obligate symbionts in an ancient and diverse insect lineage. *Environmental Microbiology*, 15(7), p.2073–2081.
- Koide, T. *et al.*, 2004. DNA microarray-based genome comparison of a pathogenic and a nonpathogenic strain of *Xylella fastidiosa* delineates genes important for bacterial virulence. *Journal of Bacteriology*, 186(16), p.5442–5449.
- Konstantinidis, K.T., Ramette, A. & Tiedje, J.M., 2006. The bacterial species definition in the genomic era. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 361(1475), p.1929–1940.
- Konstantinidis, K.T. & Tiedje, J.M., 2005. Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(7), p.2567–2572.
- Koonin, E.V. & Galperin, M.Y., 1997. Prokaryotic genomes: the emerging paradigm of genome-based microbiology. *Current Opinion in Genetics & Development*, 7(6), p.757–763.
- Kovach, M.E. *et al.*, 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene*, 166(1), p.175–176.
- Kowalczyk, M. *et al.*, 2001. DNA asymmetry and the replicational mutational pressure. *Journal of Applied Genetics*, 42(4), p.553–577.
- Kunin, V. *et al.*, 2005. The net of life: reconstructing the microbial phylogenetic network. *Genome Research*, 15(7), p.954–959.
- Kuo, C.-H. & Ochman, H., 2009. The fate of new bacterial genes. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(1), p.38–43.
- Kutschera, U. & Niklas, K.J., 2004. The modern theory of biological evolution: an expanded synthesis. *Die Naturwissenschaften*, 91(6), p.255–276.
- De La Cruz, F. *et al.*, 2010. Conjugative DNA metabolism in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(1), p.18–40.
- Lanois, A., Jubelin, G. & Givaudan, A., 2008. FlhZ, a flagellar regulator, is at the crossroads between motility, haemolysin expression and virulence in the insect pathogenic bacterium *Xenorhabdus*. *Molecular Microbiology*, 68(2), p.516–533.
- Lan, R. & Reeves, P.R., 2000. Intraspecies variation in bacterial genomes: the need for a species genome concept. *Trends in Microbiology*, 8(9), p.396–401.
- Lan, R. & Reeves, P.R., 2001. When does a clone deserve a name? A perspective on bacterial species based on population genetics. *Trends in Microbiology*, 9(9), p.419–424.

- Latreille, P. *et al.*, 2007. Optical mapping as a routine tool for bacterial genome sequence finishing. *BMC genomics*, 8, p.321.
- Lawrence, J.G., 2002. Gene transfer in bacteria: speciation without species? *Theoretical Population Biology*, 61(4), p.449-460.
- Lawrence, J.G. & Ochman, H., 1997. Amelioration of bacterial genomes: rates of change and exchange. *Journal of Molecular Evolution*, 44(4), p.383-397.
- Lawrence, J.G. & Roth, J.R., 1996. Selfish operons: horizontal transfer may drive the evolution of gene clusters. *Genetics*, 143(4), p.1843-1860.
- Lecointre, G. & Le Guyader, H., 2006. *Classification phylogénétique du vivant*, Paris: Belin.
- Lee, C.A., Jones, B.D. & Falkow, S., 1992. Identification of a *Salmonella typhimurium* invasion locus by selection for hyperinvasive mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(5), p.1847-1851.
- Lee, E.-Y. *et al.*, 2008. Proteomics in gram-negative bacterial outer membrane vesicles. *Mass Spectrometry Reviews*, 27(6), p.535-555.
- Lee, M.-M. & Stock, S.P., 2010a. A multigene approach for assessing evolutionary relationships of *Xenorhabdus* spp. (gamma-Proteobacteria), the bacterial symbionts of entomopathogenic *Steinernema* nematodes. *Journal of invertebrate pathology*, 104(2), p.67-74.
- Lee, M.-M. & Stock, S.P., 2010b. A multilocus approach to assessing co-evolutionary relationships between *Steinernema* spp. (Nematoda: Steinernematidae) and their bacterial symbionts *Xenorhabdus* spp. (gamma-Proteobacteria: Enterobacteriaceae). *Systematic parasitology*, 77(1), p.1-12.
- Lehnherr, H. *et al.*, 1993. Plasmid addiction genes of bacteriophage P1: *doc*, which causes cell death on curing of prophage, and *phd*, which prevents host death when prophage is retained. *Journal of molecular biology*, 233(3), p.414-428.
- Lemaitre, B. & Hoffmann, J., 2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Immunology*, 25, p.697-743.
- Leo, J.C., Grin, I. & Linke, D., 2012. Type V secretion: mechanism(s) of autotransport through the bacterial outer membrane. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 367(1592), p.1088-1101.
- Leplae, R. *et al.*, 2011. Diversity of Bacterial Type II Toxin–antitoxin Systems: A Comprehensive Search and Functional Analysis of Novel Families. *Nucleic Acids Research*, 39(13), p.5513-5525.
- Lerat, E. *et al.*, 2005. Evolutionary origins of genomic repertoires in bacteria. *PLoS biology*, 3(5), p.e130.
- Lerat, E. & Ochman, H., 2005. Recognizing the pseudogenes in bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 33(10), p.3125-3132.

- Lerat, E. & Ochman, H., 2004. Ψ - Φ : Exploring the outer limits of bacterial pseudogenes. *Genome Research*, 14(11), p.2273-2278.
- Letek, M. *et al.*, 2010. The genome of a pathogenic *Rhodococcus*: cooptive virulence underpinned by key gene acquisitions. *PLoS genetics*, 6(9), p.e1001145.
- Leung, V. & Lévesque, C.M., 2012. A Stress-Inducible Quorum-Sensing Peptide Mediates the Formation of Persister Cells with Noninherited Multidrug Tolerance. *Journal of Bacteriology*, 194(9), p.2265-2274.
- Levin, B.R. & Bergstrom, C.T., 2000. Bacteria are different: Observations, interpretations, speculations, and opinions about the mechanisms of adaptive evolution in prokaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(13), p.6981-6985.
- Lindsay, J.A. & Holden, M.T.G., 2004. *Staphylococcus aureus*: superbug, super genome? *Trends in Microbiology*, 12(8), p.378-385.
- Liu, G.-R. *et al.*, 2003. Genomic diversification among archival strains of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT7. *Journal of Bacteriology*, 185(7), p.2131-2142.
- Liu, H. *et al.*, 2012. *Steinernema glaseri* surface enolase: molecular cloning, biological characterization, and role in host immune suppression. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 185(2), p.89-98.
- Liu, M. *et al.*, 2008. Bacterial addiction module toxin Doc inhibits translation elongation through its association with the 30S ribosomal subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(15), p.5885-5890.
- Li, X. *et al.*, 2009. Characterization of immunosuppressive surface coat proteins from *Steinernema glaseri* that selectively kill blood cells in susceptible hosts. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 165(2), p.162-169.
- Llewelyn, M. & Cohen, J., 2002. Superantigens: microbial agents that corrupt immunity. *The Lancet Infectious Diseases*, 2(3), p.156-162.
- Lobry, J.R., 1996. Asymmetric substitution patterns in the two DNA strands of bacteria. *Molecular Biology and Evolution*, 13(5), p.660-665.
- Lobry, J.R. & Louarn, J.-M., 2003. Polarisation of prokaryotic chromosomes. *Current Opinion in Microbiology*, 6(2), p.101-108.
- Lockhart, W.R., 1967. Factors affecting reproducibility of numerical classifications. *Journal of Bacteriology*, 94(4), p.826-831.
- Los, F.C.O. *et al.*, 2013. Role of pore-forming toxins in bacterial infectious diseases. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 77(2), p.173-207.
- Lowe, A.M., Beattie, D.T. & Deresiewicz, R.L., 1998. Identification of novel staphylococcal virulence genes by in vivo expression technology. *Molecular Microbiology*, 27(5), p.967-976.

- Lu, X. *et al.*, 2014. Identification of Genetic Bases of *Vibrio fluvialis* Species-Specific Biochemical Pathways and Potential Virulence Factors by Comparative Genomic Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(6), p.2029-2037.
- Lysenko, O. & Weiser, J., 1974. Bacteria associated with the nematode *Neoaplectana carpocapsae* and the pathogenicity of this complex for *Galleria mellonella* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 24(3), p.332-336.
- Mackiewicz, P., 2004. Where does bacterial replication start? Rules for predicting the *oriC* region. *Nucleic Acids Research*, 32(13), p.3781-3791.
- Maddocks, S.E. & Oyston, P.C.F., 2008. Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology (Reading, England)*, 154(Pt 12), p.3609-3623.
- Mahan, M.J., Slauch, J.M. & Mekalanos, J.J., 1993. Selection of bacterial virulence genes that are specifically induced in host tissues. *Science*, 259(5095), p.686-688.
- Malloff, C.A., Fernandez, R.C. & Lam, W.L., 2001. Bacterial comparative genomic hybridization: a method for directly identifying lateral gene transfer. *Journal of Molecular Biology*, 312(1), p.1-5.
- Mandlik, A. *et al.*, 2011. RNA-Seq-based monitoring of infection-linked changes in *Vibrio cholerae* gene expression. *Cell Host & Microbe*, 10(2), p.165-174.
- Marraffini, L.A. & Sontheimer, E.J., 2008. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in *Staphylococci* by targeting DNA. *Science*, 322(5909), p.1843-1845.
- Marri, P.R. & Golding, G.B., 2008. Gene amelioration demonstrated: the journey of nascent genes in bacteria. *Genome / National Research Council Canada = Génome / Conseil National De Recherches Canada*, 51(2), p.164-168.
- Martens, E.C. & Goodrich-Blair, H., 2005. The *Steinernema carpocapsae* intestinal vesicle contains a subcellular structure with which *Xenorhabdus nematophila* associates during colonization initiation. *Cellular Microbiology*, 7(12), p.1723-1735.
- Maruyama, F. *et al.*, 2009. Comparative genomic analyses of *Streptococcus mutans* provide insights into chromosomal shuffling and species-specific content. *BMC genomics*, 10, p.358.
- Mathee, K. *et al.*, 2008. Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(8), p.3100-3105.
- Mavingui, P. *et al.*, 2002. Dynamics of genome architecture in *Rhizobium* sp. strain NGR234. *Journal of Bacteriology*, 184(1), p.171-176.
- Mayr, E., 1942. *Systematics and the origin of species from the viewpoint of a zoologist*, New York: Columbia University Press.
- Mayr, E., 1996. What Is a Species, and What Is Not? *Philosophy of Science*, 63(2), p.262-277.

- Mazel, D., 2006. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nature reviews. Microbiology*, 4(8), p.608-620.
- McCutcheon, J.P. & Moran, N.A., 2012. Extreme genome reduction in symbiotic bacteria. *Nature reviews. Microbiology*, 10(1), p.13-26.
- McInerney, B.V. *et al.*, 1991. Biologically active metabolites from *Xenorhabdus* spp., Part 2. Benzopyran-1-one derivatives with gastroprotective activity. *Journal of Natural Products*, 54(3), p.785-795.
- McLeod, M.P. *et al.*, 2006. The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(42), p.15582-15587.
- McMurdie, P.J. *et al.*, 2009. Localized plasticity in the streamlined genomes of vinyl chloride respiring *Dehalococcoides*. *PLoS genetics*, 5(11), p.e1000714.
- Medini, D. *et al.*, 2005. The microbial pan-genome. *Current opinion in genetics & development*, 15(6), p.589-594.
- Van Melderren, L. & Saavedra De Bast, M., 2009. Bacterial toxin-antitoxin systems: more than selfish entities? *PLoS genetics*, 5(3), p.e1000437.
- Miethke, M. & Marahiel, M.A., 2007. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 71(3), p.413-451.
- Miller, V.L. *et al.*, 1992. An unusual *pagC::TnpA* mutation leads to an invasion- and virulence-defective phenotype in *Salmonellae*. *Infection and Immunity*, 60(9), p.3763-3770.
- Mira, A. *et al.*, 2010. The bacterial pan-genome: a new paradigm in microbiology. *International microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology*, 13(2), p.45-57.
- Mira, A., Ochman, H. & Moran, N.A., 2001. Deletional bias and the evolution of bacterial genomes. *Trends in genetics: TIG*, 17(10), p.589-596.
- Morales-Soto, N. *et al.*, 2012. Comparative analysis of P2-type remnant prophage loci in *Xenorhabdus bovienii* and *Xenorhabdus nematophila* required for xenorhabdin production. *FEMS microbiology letters*, 333(1), p.69-76.
- Moran, N.A., McCutcheon, J.P. & Nakabachi, A., 2008. Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. *Annual review of genetics*, 42, p.165-190.
- Moran, N.A. & Mira, A., 2001. The process of genome shrinkage in the obligate symbiont *Buchnera aphidicola*. *Genome Biology*, 2(12), p.RESEARCH0054.
- Moran, N.A. & Plague, G.R., 2004. Genomic changes following host restriction in bacteria. *Current opinion in genetics & development*, 14(6), p.627-633.
- Morgan, J.A. *et al.*, 2001. Sequence analysis of insecticidal genes from *Xenorhabdus nematophilus* PMFI296. *Applied and environmental microbiology*, 67(5), p.2062-2069.

- Morrison, D.C. & Ryan, J.L., 1987. Endotoxins and disease mechanisms. *Annual Review of Medicine*, 38, p.417-432.
- Mouammine, A. *et al.*, 2014. Ail and PagC-Related Proteins in the Entomopathogenic Bacteria of *Photorhabdus* Genus. *PLoS ONE*, 9(10), p.e110060.
- Mráček, Z., Sturhan, D. & Reid, A., 2003. *Steinernema weiseri* n. sp. (Rhabditida, Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Europe. *Systematic Parasitology*, 56(1), p.37-47.
- Nadler, S.A., Bolotin, E. & Stock, S.P., 2006. Phylogenetic relationships of *Steinernema* Travassos, 1927 (Nematoda: Cephalobina: Steinernematidae) based on nuclear, mitochondrial and morphological data. *Systematic parasitology*, 63(3), p.161-181.
- Nakabachi, A. *et al.*, 2006. The 160-Kilobase Genome of the Bacterial Endosymbiont *Carsonella*. *Science*, 314(5797), p.267-267.
- Nakagawa, I. *et al.*, 2003. Genome sequence of an M3 strain of *Streptococcus pyogenes* reveals a large-scale genomic rearrangement in invasive strains and new insights into phage evolution. *Genome Research*, 13(6A), p.1042-1055.
- Nakamura, L.K., Roberts, M.S. & Cohan, F.M., 1999. Note: Relationship of *Bacillus subtilis* clades associated with strains 168 and W23: A proposal for *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* subsp. nov. and *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* subsp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49(3), p.1211-1215.
- Nguyen, K.B., Půža, V. & Mráček, Z., 2008. *Steinernema cholashanense* n. sp. (Rhabditida, Steinernematidae) a new species of entomopathogenic nematode from the province of Sichuan, Chola Shan Mountains, China. *Journal of invertebrate pathology*, 97(3), p.251-264.
- Nicolas, P. *et al.*, 2007. Extensive horizontal transfer of core genome genes between two *Lactobacillus* species found in the gastrointestinal tract. *BMC evolutionary biology*, 7, p.141.
- Nielsen-LeRoux, C. *et al.*, 2012. How the insect pathogen bacteria *Bacillus thuringiensis* and *Xenorhabdus/Photorhabdus* occupy their hosts. *Current opinion in microbiology*, 15(3), p.220-231.
- Nishio, M. *et al.*, 2005. Identification of the outer-membrane protein PagC required for the serum resistance phenotype in *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis. *Microbiology (Reading, England)*, 151(Pt 3), p.863-873.
- Norman, A., Hansen, L.H. & Sørensen, S.J., 2009. Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1527), p.2275-2289.
- Oakeson, K.F. *et al.*, 2014. Genome degeneration and adaptation in a nascent stage of symbiosis. *Genome Biology and Evolution*, 6(1), p.76-93.
- Obert, C. *et al.*, 2006. Identification of a Candidate *Streptococcus pneumoniae* core genome and regions of diversity correlated with invasive pneumococcal disease. *Infection and Immunity*, 74(8), p.4766-4777.

- Ochman, H. & Davalos, L.M., 2006. The nature and dynamics of bacterial genomes. *Science*, 311(5768), p.1730-1733.
- Ochman, H., Lawrence, J.G. & Groisman, E.A., 2000. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature*, 405(6784), p.299-304.
- Ochman, H., Lerat, E. & Daubin, V., 2005. Examining bacterial species under the specter of gene transfer and exchange. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(Supplement 1), p.6595-6599.
- Ochman, H. & Moran, N.A., 2001. Genes lost and genes found: evolution of bacterial pathogenesis and symbiosis. *Science*, 292(5519), p.1096-1099.
- Ogier, J.-C. *et al.*, 2010. Units of plasticity in bacterial genomes: new insight from the comparative genomics of two bacteria interacting with invertebrates, *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. *BMC Genomics*, 11, p.568.
- Okada, N. *et al.*, 1991. Virulence-associated chromosomal loci of *Shigella flexneri* identified by random Tn5 insertion mutagenesis. *Molecular Microbiology*, 5(1), p.187-195.
- Okinaka, R.T. *et al.*, 2011. An attenuated strain of *Bacillus anthracis* (CDC 684) has a large chromosomal inversion and altered growth kinetics. *BMC genomics*, 12, p.477.
- Okinaka, R.T. *et al.*, 1999. Sequence and Organization of pXO1, the Large *Bacillus anthracis* Plasmid Harboring the Anthrax Toxin Genes. *Journal of Bacteriology*, 181(20), p.6509.
- Van Opijnen, T., Bodi, K.L. & Camilli, A., 2009. Tn-seq: high-throughput parallel sequencing for fitness and genetic interaction studies in microorganisms. *Nature Methods*, 6(10), p.767-772.
- Van Opijnen, T. & Camilli, A., 2012. A fine scale phenotype-genotype virulence map of a bacterial pathogen. *Genome Research*, 22(12), p.2541-2551.
- Pallen, M.J. & Wren, B.W., 2007. Bacterial pathogenomics. *Nature*, 449(7164), p.835-842.
- Pandey, D.P. & Gerdes, K., 2005. Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. *Nucleic acids research*, 33(3), p.966-976.
- Park, D. *et al.*, 2009. Genetic analysis of xenocoumacin antibiotic production in the mutualistic bacterium *Xenorhabdus nematophila*. *Molecular microbiology*, 73(5), p.938-949.
- Parkhill, J. *et al.*, 2003. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nature Genetics*, 35(1), p.32-40.
- Parkhill, J. *et al.*, 2001. Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *Nature*, 413(6855), p.523-527.
- Park, Y. *et al.*, 2003. The bacterium *Xenorhabdus nematophilus* depresses nodulation reactions to infection by inhibiting eicosanoid biosynthesis in tobacco hornworms, *Manduca sexta*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 52(2), p.71-80.

- Paulick, A. *et al.*, 2009. Two different stator systems drive a single polar flagellum in *Shewanella oneidensis* MR-1. *Molecular microbiology*, 71(4), p.836-850.
- Pédrón, J. *et al.*, 2014. Genomic and metabolic comparison with *Dickeya dadantii* 3937 reveals the emerging *Dickeya solani* potato pathogen to display distinctive metabolic activities and T5SS/T6SS-related toxin repertoire. *BMC Genomics*, 15(1), p.283.
- Peña, A. *et al.*, 2010. Fine-scale evolution: genomic, phenotypic and ecological differentiation in two coexisting *Salinibacter ruber* strains. *The ISME journal*, 4(7), p.882-895.
- Penn, O. *et al.*, 2010. An Alignment Confidence Score Capturing Robustness to Guide Tree Uncertainty. *Molecular Biology and Evolution*, 27(8), p.1759-1767.
- Philippe, H. & Douady, C.J., 2003. Horizontal gene transfer and phylogenetics. *Current Opinion in Microbiology*, 6(5), p.498-505.
- Pinto, A.C. *et al.*, 2011. Application of RNA-seq to reveal the transcript profile in bacteria. *Genetics and molecular research: GMR*, 10(3), p.1707-1718.
- Poinar, G.O., 1966. The Presence of *Achromobacter nematophilus* in the Infective Stage of a *Neoaplectana* sp. (Steinernematidae: Nematoda). *Nematologica*, 12(1), p.105-108.
- Poinar, G.O., Jr., 1990. Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. In R. Gaugler & H. K. Kaya, éd. *Entomopathogenic nematodes in biological control*. Boca Raton, FL: CRC Press, p. 23-61.
- Poinar, G.O.J. & Thomas, G.M., 1967. The nature of *Achromobacter nematophilus* as an insect pathogen. *Journal of Invertebrate Pathology*, 9(4), p.510-514.
- Poinar, G.O. & Thomas, G.M., 1966. Significance of *Achromobacter nematophilus* Poinar and Thomas (Achromobacteraceae: Eubacteriales) in the development of the nematode, DD-136 (*Neoaplectana* sp., Steinernematidae). *Parasitology*, 56(02), p.385-390.
- Polz, M.F., Alm, E.J. & Hanage, W.P., 2013. Horizontal gene transfer and the evolution of bacterial and archaeal population structure. *Trends in Genetics*, 29(3), p.170-175.
- Popa, O. *et al.*, 2011. Directed networks reveal genomic barriers and DNA repair bypasses to lateral gene transfer among prokaryotes. *Genome Research*, 21(4), p.599-609.
- Popa, O. & Dagan, T., 2011. Trends and barriers to lateral gene transfer in prokaryotes. *Current Opinion in Microbiology*, 14(5), p.615-623.
- Prosseda, G. *et al.*, 2012. Shedding of genes that interfere with the pathogenic lifestyle: the *Shigella* model. *Research in Microbiology*, 163(6-7), p.399-406.
- Rahme, L.G. *et al.*, 1995. Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science*, 268(5219), p.1899-1902.

- Rajendhran, J. & Gunasekaran, P., 2011. Microbial phylogeny and diversity: Small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond. *Microbiological Research*, 166(2), p.99-110.
- Raskin, D.M. *et al.*, 2006. Bacterial Genomics and Pathogen Evolution. *Cell*, 124(4), p.703-714.
- Ratledge, C. & Dover, L.G., 2000. Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 54, p.881-941.
- Rattanama, P. *et al.*, 2012. Sigma E regulators control hemolytic activity and virulence in a shrimp pathogenic *Vibrio harveyi*. *PloS one*, 7(2), p.e32523.
- Raymond, B. *et al.*, 2013. Subversion of trafficking, apoptosis, and innate immunity by Type III secretion system effectors. *Trends in Microbiology*, 21(8), p.430-441.
- Razia, M. *et al.*, 2011. 16S rDNA-based phylogeny of non-symbiotic bacteria of entomo-pathogenic nematodes from infected insect cadavers. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 9(3), p.104-112.
- Records, A.R., 2011. The type VI secretion system: a multipurpose delivery system with a phage-like machinery. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI*, 24(7), p.751-757.
- Ren, D., Walker, A.N. & Daines, D.A., 2012. Toxin-antitoxin loci vapBC-1 and vapXD contribute to survival and virulence in nontypeable *Haemophilus influenzae*. *BMC Microbiology*, 12(1), p.263.
- Renelli, M. *et al.*, 2004. DNA-containing membrane vesicles of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and their genetic transformation potential. *Microbiology (Reading, England)*, 150(Pt 7), p.2161-2169.
- Ribeiro, C., Vignes, M. & Brehélin, M., 2003. *Xenorhabdus nematophila* (enterobacteriaceae) secretes a cation-selective calcium-independent porin which causes vacuolation of the rough endoplasmic reticulum and cell lysis. *The Journal of biological chemistry*, 278(5), p.3030-3039.
- Richards, G.R. & Goodrich-Blair, H., 2010. Examination of *Xenorhabdus nematophila* lipases in pathogenic and mutualistic host interactions reveals a role for xlpA in nematode progeny production. *Applied and environmental microbiology*, 76(1), p.221-229.
- Richards, G.R. & Goodrich-Blair, H., 2009. Masters of conquest and pillage: *Xenorhabdus nematophila* global regulators control transitions from virulence to nutrient acquisition. *Cellular microbiology*, 11(7), p.1025-1033.
- Roberts, A.P. *et al.*, 2008. Revised nomenclature for transposable genetic elements. *Plasmid*, 60(3), p.167-173.
- Robinson, K.M., Sieber, K.B. & Dunning Hotopp, J.C., 2013. A Review of Bacteria-Animal Lateral Gene Transfer May Inform Our Understanding of Diseases like Cancer. *PLoS Genet*, 9(10), p.e1003877.
- Rocha, E.P.C. *et al.*, 2003. A strand-specific model for chromosome segregation in bacteria. *Molecular Microbiology*, 49(4), p.895-903.
- Rocha, E.P.C., 2004a. Order and disorder in bacterial genomes. *Current opinion in microbiology*, 7(5), p.519-527.

- Rocha, E.P.C., 2008. The organization of the bacterial genome. *Annual review of genetics*, 42, p.211-233.
- Rocha, E.P.C., 2004b. The replication-related organization of bacterial genomes. *Microbiology (Reading, England)*, 150(Pt 6), p.1609-1627.
- Rocha, E.P.C. & Danchin, A., 2003. Gene essentiality determines chromosome organisation in bacteria. *Nucleic Acids Research*, 31(22), p.6570-6577.
- Roine, E. *et al.*, 1998. Characterization of Type IV pilus genes in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI*, 11(11), p.1048-1056.
- Rosa, J.S., Cabral, C. & Simões, N., 2002. Differences between the pathogenic processes induced by *Steinernema* and *Heterorhabditis* (Nemata: Rhabditida) in *Pseudaletia unipuncta* (Insecta: Lepidoptera). *Journal of Invertebrate Pathology*, 80(1), p.46-54.
- Le Roux, F. *et al.*, 2007. Construction of a *Vibrio splendidus* mutant lacking the metalloprotease gene *vsm* by use of a novel counterselectable suicide vector. *Applied and environmental microbiology*, 73(3), p.777-784.
- Ruby, E.G. *et al.*, 2005. Complete genome sequence of *Vibrio fischeri*: A symbiotic bacterium with pathogenic congeners. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(8), p.3004-3009.
- Rumbo, C. *et al.*, 2011. Horizontal Transfer of the OXA-24 Carbapenemase Gene via Outer Membrane Vesicles: A New Mechanism of Dissemination of the Carbapenem Resistance Genes in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Available at: <http://aac.asm.org/cgi/reprintframed/AAC.00929-10v1?view=long&pmid=21518847> [Consulté le mai 3, 2011].
- Rutherford, S.T. & Bassler, B.L., 2012. Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(11).
- Sahl, J.W. & Rasko, D.A., 2012. Analysis of global transcriptional profiles of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolate E24377A. *Infection and Immunity*, 80(3), p.1232-1242.
- Van Sambeek, J. & Wiesner, A., 1999. Successful parasitisation of locusts by entomopathogenic nematodes is correlated with inhibition of insect phagocytes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 73(2), p.154-161.
- Sanchez-Perez, G. *et al.*, 2008. Adapting to environmental changes using specialized paralogs. *Trends in Genetics*, 24(4), p.154-158.
- Scarborough, C.L., Ferrari, J. & Godfray, H.C.J., 2005. Aphid protected from pathogen by endosymbiont. *Science*, 310(5755), p.1781.
- Schikora, A. *et al.*, 2011. Conservation of *Salmonella* Infection Mechanisms in Plants and Animals M. Hensel, éd. *PLoS ONE*, 6(9), p.e24112.

- Schleifer, K.H., 2009. Classification of Bacteria and Archaea: past, present and future. *Systematic and Applied Microbiology*, 32(8), p.533-542.
- Schuster, C.F. & Bertram, R., 2013. Toxin-antitoxin systems are ubiquitous and versatile modulators of prokaryotic cell fate. *FEMS microbiology letters*, 340(2), p.73-85.
- Segerman, B., 2012. The genetic integrity of bacterial species: the core genome and the accessory genome, two different stories. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2, p.116.
- Sergeant, M. *et al.*, 2006. Identification, typing, and insecticidal activity of *Xenorhabdus* isolates from entomopathogenic nematodes in United Kingdom soil and characterization of the *xpt* toxin loci. *Applied and environmental microbiology*, 72(9), p.5895-5907.
- Serres, M.H. *et al.*, 2009. Evolution by leaps: gene duplication in bacteria. *Biology Direct*, 4(1), p.46.
- Sevin, E.W. & Barloy-Hubler, F., 2007. RASTA-Bacteria: a web-based tool for identifying toxin-antitoxin loci in prokaryotes. *Genome biology*, 8(8), p.R155.
- Sheets, J.J. *et al.*, 2011. Insecticidal toxin complex proteins from *Xenorhabdus nematophila*: structure and pore formation. *The Journal of biological chemistry*, 286(26), p.22742-22749.
- Sheppard, S.K. *et al.*, 2008. Convergence of *Campylobacter* species: implications for bacterial evolution. *Science*, 320(5873), p.237-239.
- Sicard, M. *et al.*, 2003. Effect of native *Xenorhabdus* on the fitness of their *Steinernema* hosts: contrasting types of interaction. *Parasitology research*, 91(6), p.520-524.
- Sicard, M. *et al.*, 2005. Effect of phenotypic variation in *Xenorhabdus nematophila* on its mutualistic relationship with the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. *Parasitology*, 131(Pt 5), p.687-694.
- Sicard, M. *et al.*, 2004. Stages of infection during the tripartite interaction between *Xenorhabdus nematophila*, its nematode vector, and insect hosts. *Applied and environmental microbiology*, 70(11), p.6473-6480.
- Sicard, M. *et al.*, 2004. When mutualists are pathogens: an experimental study of the symbioses between *Steinernema* (entomopathogenic nematodes) and *Xenorhabdus* (bacteria). *Journal of Evolutionary Biology*, 17(5), p.985-993.
- Sicard, M. *et al.*, 2014. A host as an ecosystem: *Wolbachia* coping with environmental constraints. *Environmental Microbiology*.
- Simões, N. *et al.*, 2000. Pathogenicity Caused by High Virulent and Low Virulent Strains of *Steinernema carpocapsae* to *Galleria mellonella*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 75(1), p.47-54.
- Singh, S. *et al.*, 2014. Microbial population dynamics in the hemolymph of *Manduca sexta* infected with *Xenorhabdus nematophila* and the entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae*. *Applied and Environmental Microbiology*, p.AEM.00768-14.

- Šmajš, D. *et al.*, 2011. Complete Genome Sequence of *Treponema paraluis-cuniculi*, Strain Cuniculi A: The Loss of Infectivity to Humans Is Associated with Genome Decay. *PLoS ONE*, 6(5), p.e20415.
- Sneath, P.H.A. & Cowan, S.T., 1958. An Electro-Taxonomic Survey of Bacteria. *Journal of General Microbiology*, 19(3), p.551-565.
- Sneath, P.H.A. & Sokal, R.R., 1973. *Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification.*,
- Snyder, H. *et al.*, 2011. Role of Mrx Fimbriae of *Xenorhabdus nematophila* in Competitive Colonization of the Nematode Host. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(20), p.7247-7254.
- Song, C.J. *et al.*, 2011. Bacterial metabolites of an entomopathogenic bacterium, *Xenorhabdus nematophila*, inhibit a catalytic activity of phenoloxidase of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(3), p.317-322.
- Spiridonov, S.E. *et al.*, 2004. Phylogenetic relationships within the genus *Steinernema* (Nematoda: Rhabditida) as inferred from analyses of sequences of the ITS1-5.8S-ITS2 region of rDNA and morphological features. *Nematology*, 6(4), p.547-566.
- Spiridonov, S., Krasomil-Osterfeld, K. & Moens, M., 2004. *Steinernema jolietii* sp n. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from the American midwest. *RUSSIAN JOURNAL OF NEMATOLOGY*, 12(1), p.85-95.
- Stabler, R.A. *et al.*, 2005. Identification of pathogen-specific genes through microarray analysis of pathogenic and commensal *Neisseria* species. *Microbiology (Reading, England)*, 151(Pt 9), p.2907-2922.
- Stackebrandt, E. *et al.*, 2002. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 52(Pt 3), p.1043-1047.
- Stackebrandt, E., Liesack, W. & Witt, D., 1992. Ribosomal RNA and rDNA sequence analyses. *Gene*, 115(1-2), p.255-260.
- Stanier, R.Y. & Niel, C.B. van, 1962. The concept of a bacterium. *Archiv für Mikrobiologie*, 42(1), p.17-35.
- Stewart, P.E. *et al.*, 2004. Genome-wide transposon mutagenesis of *Borrelia burgdorferi* for identification of phenotypic mutants. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(10), p.5973-5979.
- Stock, S.P. & Goodrich Blair, H., 2008. Entomopathogenic nematodes and their bacterial symbionts : The inside out of a mutualistic association. *Symbiosis*, 46, p.65-75.
- Stover, C.K. *et al.*, 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406(6799), p.959-964.

- Strauch, E. *et al.*, 2001. Characterization of enterocolitacin, a phage tail-like bacteriocin, and its effect on pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(12), p.5634-5642.
- Su, Q. *et al.*, 2014. The endosymbiont *Hamiltonella* increases the growth rate of its host *Bemisia tabaci* during periods of nutritional stress. *PloS One*, 9(2), p.e89002.
- Sugar, D.R. *et al.*, 2012. Phenotypic variation and host interactions of *Xenorhabdus bovienii* SS-2004, the entomopathogenic symbiont of *Steinernema jolietii* nematodes. *Environmental microbiology*, 14(4), p.924-939.
- Sun, Y.-C., Hinnebusch, B.J. & Darby, C., 2008. Experimental evidence for negative selection in the evolution of a *Yersinia pestis* pseudogene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(23), p.8097-8101.
- Suyama, M. & Bork, P., 2001. Evolution of prokaryotic gene order: genome rearrangements in closely related species. *Trends in Genetics*, 17(1), p.10-13.
- Suzuki, T. *et al.*, 1994. Identification and characterization of a chromosomal virulence gene, *vacJ*, required for intercellular spreading of *Shigella flexneri*. *Molecular Microbiology*, 11(1), p.31-41.
- Szekeres, S. *et al.*, 2007. Chromosomal toxin-antitoxin loci can diminish large-scale genome reductions in the absence of selection. *Molecular Microbiology*, 63(6), p.1588-1605.
- Tailliez, P. *et al.*, 2006. New insight into diversity in the genus *Xenorhabdus*, including the description of ten novel species. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56(Pt 12), p.2805-2818.
- Tailliez, P. *et al.*, 2010. Phylogeny of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* based on universally conserved protein-coding sequences and implications for the taxonomy of these two genera. Proposal of new taxa: *X. vietnamensis* sp. nov., *P. luminescens* subsp. *caribbeanensis* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *hainanensis* subsp. nov., *P. temperata* subsp. *khanii* subsp. nov., *P. temperata* subsp. *tasmaniensis* subsp. nov., and the reclassification of *P. luminescens* subsp. *thracensis* as *P. temperata* subsp. *thracensis* comb. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60(Pt 8), p.1921-1937.
- Tamames, J. *et al.*, 2007. The frontier between cell and organelle: genome analysis of *Candidatus Carsonella ruddii*. *BMC Evolutionary Biology*, 7, p.181.
- Tang, L. *et al.*, 2013. Defining natural species of bacteria: clear-cut genomic boundaries revealed by a turning point in nucleotide sequence divergence. *BMC genomics*, 14, p.489.
- Tang, L. & Liu, S.-L., 2012. The 3Cs provide a novel concept of bacterial species: messages from the genome as illustrated by *Salmonella*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 101(1), p.67-72.
- Tashiro, Y. *et al.*, 2012. RelE-Mediated Dormancy Is Enhanced at High Cell Density in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 194(5), p.1169-1176.

- Tettelin, H. *et al.*, 2005. Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: Implications for the microbial « pan-genome ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(39), p.13950 - 13955.
- Teyssier, C. *et al.*, 2003. Atypical 16S rRNA gene copies in *Ochrobactrum intermedium* strains reveal a large genomic rearrangement by recombination between *rrn* copies. *Journal of Bacteriology*, 185(9), p.2901 - 2909.
- Thaler, J.O., Baghdiguian, S. & Boemare, N., 1995. Purification and characterization of xenorhabdycin, a phage tail-like bacteriocin, from the lysogenic strain F1 of *Xenorhabdus nematophilus*. *Applied and environmental microbiology*, 61(5), p.2049 - 2052.
- Thomas, C.M., 2000. Paradigms of plasmid organization. *Molecular Microbiology*, 37(3), p.485 - 491.
- Thomas, C.M. & Nielsen, K.M., 2005. Mechanisms of, and Barriers to, Horizontal Gene Transfer between Bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 3(9), p.711 - 721.
- Thomas, C.M. & Summers, D., 2001. Bacterial Plasmids. In *eLS*. John Wiley & Sons, Ltd. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470015902.a0000468.pub2/abstract> [Consulté le septembre 15, 2014].
- Thomas, G.M. & Poinar, G.O., 1979. *Xenorhabdus* gen. nov., a Genus of Entomopathogenic, Nematophilic Bacteria of the Family *Enterobacteriaceae*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 29(4), p.352 - 360.
- Thompson, J.R. *et al.*, 2005. Genotypic diversity within a natural coastal bacterioplankton population. *Science*, 307(5713), p.1311 - 1313.
- Tillier, E.R.M. & Collins, R.A., 2000. Genome rearrangement by replication-directed translocation. *Nature Genetics*, 26(2), p.195 - 197.
- Toubarro, D. *et al.*, 2013. A Pathogenic Nematode Targets Recognition Proteins to Avoid Insect Defenses. *PLoS ONE*, 8(9). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3787073/> [Consulté le octobre 16, 2014].
- Toubarro, D. *et al.*, 2010. Serine protease-mediated host invasion by the parasitic nematode *Steinernema carpocapsae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(40), p.30666 - 30675.
- Touchon, M. *et al.*, 2009. Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. *PLoS genetics*, 5(1), p.e1000344.
- Touzain, F. *et al.*, 2011. DNA motifs that sculpt the bacterial chromosome. *Nature Reviews Microbiology*, 9(1), p.15 - 26.
- Tsolis, R.M. *et al.*, 2009. Genome degradation in *Brucella ovis* corresponds with narrowing of its host range and tissue tropism. *PloS one*, 4(5), p.e5519.
- Tucker, R.P., 2013. Horizontal gene transfer in choanoflagellates. *Journal of Experimental Zoology. Part B, Molecular and Developmental Evolution*, 320(1), p.1 - 9.

- Tümmler, B. *et al.*, 2014. Advances in understanding *Pseudomonas*. *F1000prime Reports*, 6, p.9.
- Ubeda, C. *et al.*, 2005. Antibiotic-induced SOS response promotes horizontal dissemination of pathogenicity island-encoded virulence factors in staphylococci. *Molecular Microbiology*, 56(3), p.836-844.
- Uhlich, G.A. *et al.*, 2013. Phage insertion in *mlrA* and variations in *rpoS* limit curli expression and biofilm formation in *Escherichia coli* serotype O157: H7. *Microbiology (Reading, England)*, 159(Pt 8), p.1586-1596.
- Vandamme, P. *et al.*, 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews*, 60(2), p.407-438.
- Vigneux, F. *et al.*, 2007. The *xaxAB* Genes Encoding a New Apoptotic Toxin from the Insect Pathogen *Xenorhabdus nematophila* Are Present in Plant and Human Pathogens. *Journal of Biological Chemistry*, 282(13), p.9571 -9580.
- Vos, M., 2011. A species concept for bacteria based on adaptive divergence. *Trends in Microbiology*, 19(1), p.1-7.
- Voth, D.E., Broederdorf, L.J. & Graham, J.G., 2012. Bacterial Type IV secretion systems: versatile virulence machines. *Future microbiology*, 7(2), p.241-257.
- De Vries, J. & Wackernagel, W., 2002. Integration of foreign DNA during natural transformation of *Acinetobacter* sp. by homology-facilitated illegitimate recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(4), p.2094-2099.
- Wang, X. & Wood, T.K., 2011. Toxin-antitoxin systems influence biofilm and persister cell formation and the general stress response. *Applied and environmental microbiology*, 77(16), p.5577-5583.
- Wang, Y. & Gaugler, R., 1999. *Steinernema glaseri* Surface Coat Protein Suppresses the Immune Response of *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) Larvae. *Biological Control*, 14(1), p.45-50.
- Wassenaar, T.M. & Gaastra, W., 2001. Bacterial virulence: can we draw the line? *FEMS microbiology letters*, 201(1), p.1-7.
- Waterfield, N.R. *et al.*, 2008. Rapid Virulence Annotation (RVA): Identification of virulence factors using a bacterial genome library and multiple invertebrate hosts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(41), p.15967 -15972.
- Wattam, A.R. *et al.*, 2014. Comparative phylogenomics and evolution of the *Brucellae* reveal a path to virulence. *Journal of bacteriology*, 196(5), p.920-930.
- Wayne, L.G. *et al.*, 1988. International Committee on Systematic Bacteriology announcement of the report of the ad hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics. *Journal of Applied Bacteriology*, 64(4), p.283-284.

- Welch, R.A. *et al.*, 2002. Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(26), p.17020-17024.
- Westermann, A.J., Gorski, S.A. & Vogel, J., 2012. Dual RNA-seq of pathogen and host. *Nature Reviews Microbiology*, 10(9), p.618-630.
- Winslow, C.-E.A. *et al.*, 1917. The Families and Genera of the Bacteria. *Journal of Bacteriology*, 2(5), p.505-566.
- Woese, C.R., 1987. Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, 51(2), p.221-271.
- Wolfgang, M.C. *et al.*, 2003. Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(14), p.8484-8489.
- Wolf, Y.I. & Koonin, E.V., 2013. Genome reduction as the dominant mode of evolution. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 35(9), p.829-837.
- Wood, D.W. *et al.*, 2001. The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science*, 294(5550), p.2317-2323.
- Wozniak, R.A.F. & Waldor, M.K., 2010. Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nature reviews. Microbiology*, 8(8), p.552-563.
- Wu, H.-J., Wang, A.H.-J. & Jennings, M.P., 2008. Discovery of virulence factors of pathogenic bacteria. *Current Opinion in Chemical Biology*, 12(1), p.93-101.
- Xu, J. *et al.*, 1991. Characterization of Tn5-Induced Mutants of *Xenorhabdus nematophilus* ATCC 19061. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(4), p.1173-1180.
- Yang, J., Tauschek, M. & Robins-Browne, R.M., 2011. Control of bacterial virulence by AraC-like regulators that respond to chemical signals. *Trends in microbiology*, 19(3), p.128-135.
- Yerrapragada, S., Siefert, J.L. & Fox, G.E., 2009. Horizontal gene transfer in cyanobacterial signature genes. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 532, p.339-366.
- Yoder-Himes, D.R. *et al.*, 2009. Mapping the *Burkholderia cenocepacia* niche response via high-throughput sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(10), p.3976-3981.
- Zhang, Y. *et al.*, 2003. MazF Cleaves Cellular mRNAs Specifically at ACA to Block Protein Synthesis in *Escherichia coli*. *Molecular Cell*, 12(4), p.913-923.
- Zheng, W.H. *et al.*, 2013. Evolutionary relationships of ATP-Binding Cassette (ABC) uptake porters. *BMC Microbiology*, 13, p.98.

Annexes

Tableau annexe 1. Amorces et enzymes de restriction utilisées pour le clonage des facteurs de virulence potentiels dans le pBBR1-MCS2. Pour chaque amorce, les sites de coupure par les enzymes de restriction sont indiqués en gras.

Gènes amplifiés	Amorce gauche		Amorce droite		Génome utilisé pour l'amplification	Sites de restriction
	Nom	Séquence 3'-5'	Nom	Séquence 3'-5'	<i>X. nematophila</i>	<i>Sall-XbaI</i>
XNC1_2096	<i>Sall_XNC1_2096_f</i>	GCGC GTCTGACT GAAACTTTTGGTTAGGGAGG A	XNC1_2096_ <i>XbaI_r</i>	CGCG TCTAGAC GGCATTGAAATGAAAAACC		
XNC1_2075	<i>Sall_XNC1_2075_f</i>	GCGC GTCTGACT GAAACCATGGCTATTTGGGTA	XNC1_2075_ <i>XbaI_r</i>	CGCG TCTAGAT CCCATGATTGGATAATGGCTAA		
XNC1_2244-2145	<i>Sall_XNC1_2244_f</i>	GCGC GTCTGACC ATCTTGATGCTTTGCTAATATA CA	XNC1_2245_ <i>XbaI_r</i>	CGCG TCTAGAT CCCAAGCCTTATGTACCTGAT		
XNC1_2207	<i>Sall_XNC1_2207_f</i>	GCGC GTCTGACT ATCTGTAATGGGCGGGAGT	XNC1_2207_ <i>XbaI_r</i>	CGCG TCTAGAT GCTCATGGCAAAAGAACTG		
XNC1_3196	<i>Sall_XNC1_3196_f</i>	GCGC GTCTGACT CAAATCGCGTAAACACTGG	XNC1_3196_ <i>XbaI_r</i>	CGCG TCTAGAT GGGAAAATTGTTGTTTCAGG		
XNC1_0202-0203	<i>Sall_XNC1_0202_f</i>	GCGC GTCTGAC GGGATCTGCGTTGTTGAATA	XNC1_0203_ <i>XbaI_r</i>	CGCG TCTAGAT GTTCCTTGCATCCTCAAAA		
XNC1_3102	<i>Sall_XNC1_3102_f</i>	GCGC GTCTGAC ACAGGTATAGAAGTACCCCGTC TG	XNC1_3102_ <i>XbaI_r</i>	CGCG TCTAGA ACGCTTGGTTTTCAATGGAT		
<i>pagC</i>	<i>Sall_pagC_XD_fw</i>	GCA GTCTGAC CCGATTGCCTGACAGAACT	<i>XbaI_pagC_XD_rev</i>	GCAT TCTAGAG TGGCCTTCCCCATAAAAA	<i>X. doucetiae</i>	<i>Sall-EcoRI</i>
XDD1v5_0556-0557	<i>Sall_XDV4_0557_f</i>	GCGC GTCTGAC GCAAGTGCAGTATCAACAAA	XDV4_0556_ <i>XbaI_r</i>	CGCG TCTAGAT TGAATGCAGGGTGTAGTGC		
XDD1v5_0560-0561	<i>Sall_XDV4_0561_f</i>	GCGC GTCTGACT GGGTGAGACAAAGTTGCAT	XDV4_0560_ <i>EcoRI_r</i>	GCGC GAATTCT CCGGTCATCGATTTTCTTC		
XNC1_2096	N-ter_ <i>NdeI</i> _2096LP	CGCG CATATGA TGCCGTTACATCTTGAAAAAT ATAGATAA	N-ter- <i>EcoRI</i> _2096RP	GCGC GAATTC CGGCATTGAAATGAAAAACC	<i>X. nematophila</i>	<i>NdeI/EcoRI</i>

Tableau annexe 2. Souches et plasmides utilisés dans le clonage des facteurs de virulence potentiels de *Xenorhabdus*.

Souches ou plasmides	Génotypes ou caractéristiques	Source ou référence
Souches de <i>Xenorhabdus</i>		
<i>X. nematophila</i> ATCC19061	Souche isolée du nématode <i>S. carpocapsae</i> , type sauvage	Thomas & Poinar (1979)
<i>X. doucetiae</i> FRM16	Souche isolée du nématode <i>S. diaprepesi</i> , type sauvage	Tailliez et al. (2006)
<i>X. bovienii</i> SS2004	Souche isolée du nématode <i>S. jolietti</i> , type sauvage	Chaston et al. (2011)
<i>Xb</i> CS03	Souche isolée du nématode <i>S. weiserii</i> 583, type sauvage	Tailliez et al. (2006)
<i>Xp</i> G6	Souche isolée du nématode <i>S. glaseri</i> , type sauvage	Akhurst (1986)
<i>Xb</i> CS03/pBB- <i>xaxAB</i>	Souche obtenue par conjugaison, <i>Xb</i> CS03 contenant le plasmide pBBR1-MCS2 portant l'insert <i>xaxAB</i> , Km ^R	Ce travail
<i>Xb</i> CS03/pBB- <i>pagC</i>	Souche obtenue par conjugaison, <i>Xb</i> CS03 contenant le plasmide pBBR1-MCS2 portant l'insert <i>pagC</i> , Km ^R	Ce travail
<i>Xb</i> CS03/pBB-2096	Souche obtenue par conjugaison, <i>Xb</i> CS03 contenant le plasmide pBBR1-MCS2 portant l'insert XNC1_2096, Km ^R	Ce travail
<i>Xb</i> CS03/pBB-2075	Souche obtenue par conjugaison, <i>Xb</i> CS03 contenant le plasmide pBBR1-MCS2 portant l'insert XNC1_2075, Km ^R	Ce travail
<i>Xb</i> CS03/pBB-2244/2245	Souche obtenue par conjugaison, <i>Xb</i> CS03 contenant le plasmide pBBR1-MCS2 portant l'insert XNC1_2244-2245, Km ^R	Ce travail
<i>Xb</i> CS03/pBB-2207	Souche obtenue par conjugaison, <i>Xb</i> CS03 contenant le plasmide pBBR1-MCS2 portant l'insert XNC1_2207, Km ^R	Ce travail
<i>Xb</i> CS03/pBB-3196	Souche obtenue par conjugaison, <i>Xb</i> CS03 contenant le plasmide pBBR1-MCS2 portant l'insert XNC1_3196, Km ^R	Ce travail
<i>Xb</i> CS03/pBB- <i>phd/doc</i>	Souche obtenue par conjugaison, <i>Xb</i> CS03 contenant le plasmide pBBR1-MCS2 portant l'insert XNC1_0202-0203, Km ^R	Ce travail
<i>Xb</i> CS03/pBB-3102	Souche obtenue par conjugaison, <i>Xb</i> CS03 contenant le plasmide pBBR1-MCS2 portant l'insert XNC1_3102, Km ^R	Ce travail
<i>Xb</i> CS03/pBB- <i>mazEF</i>	Souche obtenue par conjugaison, <i>Xb</i> CS03 contenant le plasmide pBBR1-MCS2 portant l'insert XDD1v5_0556-0557, Km ^R	Ce travail
<i>Xb</i> CS03/pBB- <i>mazEF-like</i>	Souche obtenue par conjugaison, <i>Xb</i> CS03 contenant le plasmide pBBR1-MCS2 portant l'insert XDD1v5_0560-0561, Km ^R	Ce travail
<i>Xp</i> G6/pBB- <i>xaxAB</i>	Souche obtenue par conjugaison, <i>Xp</i> G6 contenant le plasmide pBBR1-MCS2 portant l'insert <i>xaxAB</i> , Km ^R	Ce travail
<i>Xp</i> G6/pBB- <i>pagC</i>	Souche obtenue par conjugaison, <i>Xp</i> G6 contenant le plasmide pBBR1-MCS2 portant l'insert <i>pagC</i> , Km ^R	Ce travail
<i>Xp</i> G6/pBB-2096	Souche obtenue par conjugaison, <i>Xp</i> G6 contenant le plasmide pBBR1-MCS2 portant l'insert XNC1_2096, Km ^R	Ce travail

<i>Xp G6/pBB-2075</i>	Souche obtenue par conjugaison, <i>Xp G6</i> contenant le plasmide pBBR1-MCS2 portant l'insert XNC1_2075, Km ^R	Ce travail
<i>Xp G6/pBB-2244/2245</i>	Souche obtenue par conjugaison, <i>Xp G6</i> contenant le plasmide pBBR1-MCS2 portant l'insert XNC1_2244-2245, Km ^R	Ce travail
<i>Xp G6/pBB-2207</i>	Souche obtenue par conjugaison, <i>Xp G6</i> contenant le plasmide pBBR1-MCS2 portant l'insert XNC1_2207, Km ^R	Ce travail
<i>Xp G6/pBB-3196</i>	Souche obtenue par conjugaison, <i>Xp G6</i> contenant le plasmide pBBR1-MCS2 portant l'insert XNC1_3196, Km ^R	Ce travail
<i>Xp G6/pBB-phd/doc</i>	Souche obtenue par conjugaison, <i>Xp G6</i> contenant le plasmide pBBR1-MCS2 portant l'insert XNC1_0202-0203, Km ^R	Ce travail
<i>Xp G6/pBB-3102</i>	Souche obtenue par conjugaison, <i>Xp G6</i> contenant le plasmide pBBR1-MCS2 portant l'insert XNC1_3102, Km ^R	Ce travail
<i>Xp G6/pBB-mazEF</i>	Souche obtenue par conjugaison, <i>Xp G6</i> contenant le plasmide pBBR1-MCS2 portant l'insert XDD1v5_0556-0557, Km ^R	Ce travail
<i>Xp G6/pBB-mazEF-like</i>	Souche obtenue par conjugaison, <i>Xp G6</i> contenant le plasmide pBBR1-MCS2 portant l'insert XDD1v5_0560-0561, Km ^R	Ce travail
Souches d'<i>E.coli</i>		
XL1 blue MRF'	$\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 \text{ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac } [F' \text{ proAB lacI}^q \Delta M15 Tn10 (Tet^r)]$	Stratagene
WM3064	<i>thrB1004 pro thi rpsL hsdS lacZ</i> $\Delta M15$ RP4-1360 $\Delta(araBAD)567 \Delta dapA1341::[erm \text{ pir (wt)}]$	Paulick et al. (2009)
BL21 (DE3) pLysS	$F' dcm ompT hsdS(r_B^- m_B^-) gal \lambda(DE3)$ (pLysS Cam ^R)	Stock du laboratoire
Plasmides		
pBBR1-MCS2	Vecteur à large spectre d'hôtes, Km ^R <i>mob</i>	Kovach et al. (1995)
pBB-xaxAB	Fragment de 2,5 kb obtenu par hydrolyse du pBBR1mcs5-xaxAB et inséré entre les sites Sall et XbaI de pBBR1-MCS2	Vigneux et al. (2007), ce travail
pBB-pagC	Fragment de PCR de 0,68 kb obtenu avec les amorces <i>Sall_pagC_XD_fw</i> et <i>XbaI_pagC_XD_rev</i> et inséré entre les sites <i>Sall</i> et <i>XbaI</i> du pBBR1-MCS2	Ce travail
pBB-2096	Fragment de PCR de 0,69 kb obtenu avec les amorces <i>Sall_XNC1_2096_f</i> et <i>XNC1_2096_XbaI_r</i> et inséré entre les sites <i>Sall</i> et <i>XbaI</i> du pBBR1-MCS2	Ce travail
pBB-2075	Fragment de PCR de 0,30 kb obtenu avec les amorces <i>Sall_XNC1_2075_f</i> et <i>XNC1_2075_XbaI_r</i> et inséré entre les sites <i>Sall</i> et <i>XbaI</i> du pBBR1-MCS2	Ce travail
pBB-2244/2245	Fragment de PCR de 1,9 kb obtenu avec les amorces <i>Sall_XNC1_2244_f</i> et <i>XNC1_2245_XbaI_r</i> et inséré entre les sites <i>Sall</i> et <i>XbaI</i> du pBBR1-MCS2	Ce travail

pBB-2207	Fragment de PCR de 0,32 kb obtenu avec les amorces <i>Sall</i> _XNC1_2207_f et XNC1_2207_ <i>XbaI</i> _r et inséré entre les sites <i>Sall</i> et <i>XbaI</i> du pBBR1-MCS2	Ce travail
pBB-3196	Fragment de PCR de 0,40 kb obtenu avec les amorces <i>Sall</i> _XNC1_3196_f et XNC1_3196_ <i>XbaI</i> _r et inséré entre les sites <i>Sall</i> et <i>XbaI</i> du pBBR1-MCS2	Ce travail
pBB- <i>phd/doc</i>	Fragment de PCR de 0,71 kb obtenu avec les amorces <i>Sall</i> _XNC1_0202_f et XNC1_0203_ <i>XbaI</i> _r et inséré entre les sites <i>Sall</i> et <i>XbaI</i> du pBBR1-MCS2	Ce travail
pBB-3102	Fragment de PCR de 1,1 kb obtenu avec les amorces <i>Sall</i> _XNC1_3102_f et XNC1_3102_ <i>XbaI</i> _r et inséré entre les sites <i>Sall</i> et <i>XbaI</i> du pBBR1-MCS2	Ce travail
pBB- <i>mazEF</i>	Fragment de PCR de 0,68 kb obtenu avec les amorces <i>Sall</i> _XDv4_0557_f et XDv4_0556_ <i>XbaI</i> _r et inséré entre les sites <i>Sall</i> et <i>XbaI</i> du pBBR1-MCS2	Ce travail
pBB- <i>mazEF-like</i>	Fragment de PCR de 0,74 kb obtenu avec les amorces <i>Sall</i> _XDv4_0561_f et XDv4_0560_ <i>EcoRI</i> _r et inséré entre les sites <i>Sall</i> et <i>EcoRI</i> du pBBR1-MCS2	Ce travail
pET28a	Ap ^R	Ce travail
peT28a-XNC1-2096	pET28a surproduisant la protéine codée par le gène XNC1-2096 avec un tag 6-histidines à l'extrémité N-terminale et sous contrôle du promoteur T7; Ap ^R	Ce travail

Entomopathogenic bacteria from the *Xenorhabdus* genus: Pathologic survey and genomics of virulence-attenuated strains.

Xenorhabdus enterobacteria are pathogenic of insect larvae and symbiotic of nematodes from the *Steinernema* genus. The *Steinernema-Xenorhabdus* associations are used against a wide range of insect pests. The two partners of the model *Steinernema carpocapsae-Xenorhabdus nematophila* association can be experimentally dissociated and stay pathogenic for insect larvae. However, some other *Xenorhabdus* strains are non-virulent when injected directly into insect larvae.

In this thesis, we characterize two non-virulent *Xenorhabdus* strains, *X. poinarii* G6 (*Xp* G6) and *X. bovienii* CS03 (*Xb* CS03). Strains from the *X. poinarii* species have small-sized genomes. We showed that the *Xp* G6 strain had undergone a genome reduction due to the deletion of large genomic regions. Transfer of virulence functions from the bacteria to the nematode and/or the specialization of the association towards coleopteran insects could be the origin of this evolution. Within the *X. bovienii* species, *Xb* CS03 is the only non virulent strain when injected into the *Spodoptera littoralis* and *Galleria mellonella* lepidopteran insects. When compared to other *Steinernema-X. bovienii* pairs, the association between *Xb* CS03 and its symbiotic nematode *S. weiseri* 583 has a lower virulence on those insects. *Xb* CS03 has a large-sized genome and harbors numerous degraded genes (pseudogenes). Genome comparison between *Xb* CS03 and a virulent strain from the same species, *X. bovienii* SS-2004 (*Xb* SS-2004), show that *Xb* CS03 contains more NRPS/PKS (*non-ribosomal peptide synthase/polyketide synthetase*) enzymatic assembly loci, producing potential antimicrobial metabolites, than *Xb* SS-2004. On the other hand, *Xb* SS-2004 contains more genes encoding virulence factors such as hemolysins, adhesins or secretion systems. This suggests that the two strains have followed different evolutive scenarii, favoring strong virulence in *Xb* SS-2204 and elimination of competitors for *Xb* CS03.

Finally, we searched for potential virulence factors by comparing the genomes of the non-virulent strains *Xp* G6 and *Xb* CS03 with three virulent strains. Functional analysis of the candidates is in progress.

In conclusion, characterizing new bacterial models in the *Xenorhabdus* genus paves the way for the identification of new virulence strategies and new virulence genes in entomopathogenic bacteria.

Keywords :

Xenorhabdus; nematode; *Steinernema*; virulence; entomopathogenic bacteria; genome comparison.

Les bactéries entomopathogènes du genre *Xenorhabdus* : description pathologique et génomique de souches à la virulence atténuée.

Les entérobactéries du genre *Xenorhabdus* sont pathogènes de larves d'insectes et symbiotiques de nématodes du genre *Steinernema*. En lutte biologique, les couples *Steinernema-Xenorhabdus* sont utilisés contre un large spectre d'insectes ravageurs de culture. Les deux partenaires du couple modèle *Steinernema carpocapsae-Xenorhabdus nematophila* peuvent être expérimentalement dissociés tout en restant pathogènes pour les insectes. En revanche, certaines souches de *Xenorhabdus* sont non-virulentes lorsqu'elles sont injectées directement dans une larve d'insecte.

L'objectif de cette thèse est de caractériser deux souches non-virulentes de *Xenorhabdus*, *X. poinarii* G6 (*Xp* G6) et *X. bovienii* CS03 (*Xb* CS03). Les souches appartenant à l'espèce non-virulente *X. poinarii* possèdent des génomes de petite taille. Nous avons mis en évidence un phénomène de réduction génomique due à la délétion de larges régions génomiques chez la souche *Xp* G6. Cette évolution pourrait avoir eu lieu suite à un transfert des fonctions bactériennes de virulence à son nématode hôte et/ou à sa spécialisation envers certains coléoptères. Au sein de l'espèce *X. bovienii*, *Xb* CS03 est la seule souche non-virulente par injection dans les lépidoptères *Spodoptera littoralis* et *Galleria mellonella*. Par rapport à d'autres couples némato-bactériens *Steinernema* sp.-*X. bovienii*, le couple formé par *Xb* CS03 et son nématode symbiotique *S. weiseri* 583 - présente également une virulence atténuée sur ces lépidoptères. Le génome de *Xb* CS03 est de très grande taille et contient un grand nombre de gènes dégradés (pseudogènes). Une comparaison génomique entre *Xb* CS03 et une souche virulente appartenant à la même espèce, *X. bovienii* SS-2004 (*Xb* SS-2004), montre que *Xb* CS03 est plus riche que *Xb* SS-2004 en gènes codant des chaînes d'assemblage enzymatiques NRPS/PKS (*non-ribosomal peptide synthase/polyketide synthetase*) produisant des métabolites antimicrobiens potentiels. A l'inverse, *Xb* SS-2004 contient davantage de gènes codant des facteurs de virulence de type hémolysine, adhésine ou systèmes de sécrétion. Ceci suggère deux scénarii évolutifs différents, privilégiant une forte virulence pour *Xb* SS-2004 et l'élimination des compétiteurs au sein du cadavre de l'insecte pour *Xb* CS03.

Enfin, une recherche de facteurs de virulence potentiels a été effectuée par une approche de génomique comparative entre les souches non-virulentes *Xp* G6 et *Xb* CS03 d'une part et trois souches de *Xenorhabdus* virulentes, d'autre part. L'analyse fonctionnelle de gènes candidats a été entamée.

En conclusion, la caractérisation de nouveaux modèles bactériens dans le genre *Xenorhabdus* ouvre le champ à l'identification de nouvelles stratégies de virulence et de nouveaux facteurs de virulence chez les bactéries entomopathogènes.

Mots-clés :

Xenorhabdus ; nématode ; *Steinernema* ; virulence ; bactérie entomopathogène ; comparaison génomique.